

N° D'ORDRE

95

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE LYON

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS-SCIENCES

PAR

Jean ENSELME

Docteur en Médecine

Ancien interne provisoire des Hôpitaux de Lyon

1^{re} THÈSE

Contribution chimique à l'étude de la molécule protidique

2^e THÈSE

Propositions données par la Faculté

Soutenues en avril, devant la Commission d'examen

MM. CARDOT, *Président*

HUGOUNENQ

BEAUVÉRIE

FROMAGEOT

LYON

EDITIONS DU SERVICE PHOTOGRAPHIQUE

DE L'UNIVERSITÉ

1930

CONTRIBUTION CHIMIQUE
A L'ÉTUDE DE LA MOLÉCULE PROTIDIQUE



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41553621_0018

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE LYON

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS-SCIENCES

PAR

Jean ENSELME

Docteur en Médecine

Ancien interne provisoire des Hôpitaux de Lyon

1^{re} THÈSE

Contribution chimique à l'étude de la molécule protidique

2^e THÈSE

Propositions données par la Faculté

Soutenues en avril, devant la Commission d'examen

MM. CARDOT, *Président*

HUGOUNENQ

BEAUVÉRIE

FROMAGEOT

LYON

EDITIONS DU SERVICE PHOTOGRAPHIQUE

DE L'UNIVERSITÉ

1930.

UNIVERSITÉ DE LYON — FACULTÉ DES SCIENCES

Doyen :

M. GRIGNARD, O.  I,  P. N., Membre de l'Institut, Chimie générale.

Assesseur :

M. VANEY,  I, .

Professeurs honoraires :

MM. VESSIOT, O.  I;

GÉRARD, O.  I,  C; RIGOLLOT,  I;

VAUTIER,  I; LE VAVASSEUR,  I;

OFFRET,  I, .

COUTURIER,  I, .

Professeurs titulaires :

MM. GRIGNARD, O.  I,  P. N., Membre de l'Institut, Chimie générale.

KOEHLER, O.  I,  Correspondant de l'Institut, Zoologie.

DULAC,  I, Calcul différentiel et intégral.

MASCART,  I,  Astronomie physique.

SIRE,  I,  Mécanique rationnelle et appliquée.

MEUNIER,  I, Chimie industrielle.

BEAUVÉRIE,  I,  Botanique.

THOVERT,  I,  Physique.

CARDOT,  I, Physiologie générale et comparée.

VANEY,  I,  Zoologie.

LONGCHAMBON,  I,  Minéralogie théorique et appliquée.

LOCQUIN,  I, Chimie générale.

ROMAN,  I, Géologie.

Professeurs titulaires (sans chaire) :

MM. DOUIN,  Botanique.

DEJARDIN,  Physique.

LEMARCHANDS,  I Chimie industrielle.

EYRAUD,  Mathématiques.

Maîtres de Conférences et Chargés de Cours complémentaires :

MM. AUMÉRAS, Chimie physique.

FROMAGEOT, Chimie agricole.

BONNET,  I, Zoologie appliquée et Zootechnie.

MAYET,  I, Anthropologie.

PELOSSE,  I, Sériciculture.

DONCIEUX,  I, P. C. N. supérieur.

SEYEWETZ,  I, Matières colorantes artificielles.

M^{lle} BACHRACH,  Physiologie.

Secrétaire :

M^{me} NÉTIEN, .



*Que notre Maître M. le Professeur HUGOUNENQ
veuille bien accepter l'hommage de ce travail.*

*Il fut pour nous toujours l'exemple de la pensée la
plus élevée, de la science la plus sûre et de la bonté la
plus délicate. Nous sommes fier d'être depuis long-
temps déjà l'objet d'une particulière bienveillance de
sa part et c'est très ému que nous le remercions infini-
ment.*

*Notre reconnaissance va également aux maîtres qui
nous ont aidé dans la réalisation de cette étude.*

*A M. le Professeur CARDOT, qui a bien voulu
accepter la présidence de cette thèse ; à M. le Profes-
seur MOREL, qui nous a si souvent aidé de ses conseils
avisés et dont la vaste science nous fut si précieuse ;
à M. le Professeur FLORENCE qui, de très près, a
suivi nos recherches et fut toujours pour nous un
maître affectueux.*

*A nos juges, M. le Professeur BEAUVÉRIE et M. le
Professeur FROMAGEOT, que nous remercions de
leur bienveillant accueil.*

A MA FEMME,
collaboratrice de tous les instants

AVANT-PROPOS

Les protocoles expérimentaux sont généralement précédés par une étude critique des techniques qui furent employées. Le lecteur peut ainsi plus facilement dégager la valeur réelle des résultats obtenus. Cependant l'instrument directeur de toute recherche : la discipline logique à laquelle consciemment ou inconsciemment s'est soumis l'expérimentateur, est rarement passée au crible d'un aussi sévère examen. Celui-ci serait-il d'ailleurs de quelque utilité ? « Un esprit droit et surtout attentif », écrit M. Goblot, « peut raisonner fort bien sans penser aux règles qu'il observe et sans les connaître. Il se forme mieux par la pratique des sciences et des méthodes que par l'étude des préceptes de la logique ».

Aucune méthode certes ne saurait faire naître l'idée scientifique originale et féconde. Cependant, au moins, chez ceux qui, comme nous, n'ont point encore une longue pratique des sciences, nous pensons que l'étude de la logique permet d'introduire dans l'interprétation des faits expérimentaux plus de souplesse et plus d'exactitude. C'est pourquoi, en manière de préface à ce travail, nous nous permettrons quelques réflexions sur le problème logique de « l'hypothèse en biochimie ».

*
*
*

M. Blanchetière, dans une récente étude, a défini ainsi les qualités de l'hypothèse. « Ses caractères, dit-

il, sont au nombre de trois : 1° elle ne doit contredire aucun fait établi avec certitude ; 2° elle doit relier entre eux les faits déjà connus ; 3° elle doit permettre enfin de prévoir des faits nouveaux ».

Ce sont là trois critères : conformité au réel, économie de pensée, et fécondité, qui caractérisent le triple aspect du problème que nous étudions.

*
* *

Un certain nombre de faits étant solidement établis par l'expérience, il convient de les résumer par un système cohérent qui rende compte de tous ces faits et ne soit en contradiction avec aucun. L'hypothèse est donc avant tout une synthèse qui, ultérieurement, permettra par déduction de retrouver les faits. Pour être utilisable, elle doit être simple et facile à retenir. Elle se présente comme un ensemble qui s'introduira désormais en bloc dans nos raisonnements, et qui, par là, constituera bien une économie de mémoire et une économie de pensée.

Mais dès lors, elle constitue une arme à double tranchant, dont le danger doit être connu. Un concept nouveau est né qui contient en potentiel un nombre considérable de faits. Grâce à lui et souvent à notre insu, par la magie du langage scientifique, nous introduirons dans la discussion et dans nos réflexions la totalité des faits qu'il représente. Il diminue donc en quelque sorte notre attention, et tend à atténuer notre esprit critique.

∴

Il est classique de distinguer deux sortes d'esprits :

Les uns rapportant spontanément à un schéma spatial les observations réalisées au moyen des sens. Les autres plus abstraits se contentant de rapprocher les phénomènes, de leur trouver des liens idéaux sans jamais tendre à les expliquer par un schéma. Au premier type d'esprit, il convient d'attribuer nos formules chimiques et surtout nos schémas stéréochimiques.

Chaque propriété nouvelle s'inscrit par une modification du schéma qui s'organise dans les trois dimensions de l'espace.

La chimie biologique relève à chaque instant d'un semblable système d'explication. La stéréo-chimie n'y joue-t-elle pas chaque jour un rôle plus important ? L'étude des sucres et des protides en donne de nombreux exemples. La chimie pathologique fait, elle aussi, appel à de semblables hypothèses et l'on sait par exemple que le diabète trouve aujourd'hui une explication possible dans une modification stéréo-isomérique du glucose.

Plus rare et sans doute aussi d'un maniement plus difficile est l'hypothèse abstraite. Elle cherche l'explication du fait actuel dans le fait antérieur, et seuls la constituent ces liens qui sont le plus souvent des constatations de coïncidences ou de successions. Une telle discipline de la pensée a créé l'énergétique. La thermodynamique est son domaine.

La chimie biologique moderne qui demande cons-

tamment l'explication des faits qu'elle constate à la chimie physique utilise aujourd'hui déjà un grand nombre d'hypothèses de ce type.

Une telle attitude de l'esprit semble née avec Newton. Elle apparaît depuis constamment en lutte contre l'hypothèse de structure. Celle-ci n'apporte-t-elle pas à la science le désir illégitime des « explications » substitué à la notion plus sage des « causes » ? C'est ainsi que Comte, dans sa « théorie fondamentale des hypothèses », affirme qu'il ne convient point de rechercher le « mode de production des phénomènes, puérilité dont l'origine est toujours la même et se rattache constamment à cette enquête sur la nature intime des choses qui caractérise en tout genre l'enfance de l'esprit humain ».

Cette hostilité s'exagère vers 1890, elle accueille avec scepticisme les premières spéculations stéréochimiques.

En 1906, elle éclate dans « la théorie physique » de Duhem. « Une théorie physique, écrit-il, n'est pas une explication, c'est un système de propositions mathématiques déduites d'un petit nombre de principes qui ont pour but de représenter aussi simplement, aussi complètement et exactement que possible, un ensemble des lois expérimentales ».

Les faits aujourd'hui imposent une réconciliation. Ces deux aspects de la pensée se rencontrent le plus souvent dans leurs déductions. Nombre de faits physico-chimiques peuvent être expliqués à la fois par l'hypothèse cinétique et par la thermodynamique, montrant par là une heureuse coïncidence de ces deux sys-

tèmes d'explication. D'ailleurs ce parallélisme s'explique bien. Les théories abstraites s'appliquent plus spécialement aux phénomènes énergétiques, de même que les hypothèses de constitution s'adaptent mieux aux propriétés de la matière. Les discussions qu'elles ont soulevées reflétaient dans l'ordre logique les luttes qui se livraient entre unicistes et dualistes autour du problème métaphysique de la matière et de l'énergie. Il semble que la théorie de la relativité qui confère une inertie à l'énergie et la théorie des quanta qui introduit dans l'énergie la notion de discontinuité jusque-là réservée à la matière, doive atténuer les anciennes oppositions.

..

Que l'hypothèse appartienne à l'un ou l'autre type, elle doit tendre vers une adaptation absolue des faits à notre pensée. Or, cette adaptation parfaite ne saurait se réaliser que par l'intermédiaire des mathématiques. Celles-ci, sous condition d'un certain nombre de conventions, constituent un système déductif qui représente l'expression la plus simple, la plus exacte et la plus sobre de notre pensée.

La difficulté que nous éprouvons à exprimer en langage mathématique les résultats de nos expériences mesure l'éloignement qui subsiste entre les faits et notre pensée.

L'hypothèse abstraite s'adapte facilement aux exigences de l'analyse. Son fondateur même n'avait-il pas facilité l'union des mathématiques et du concret physique ?

« L'idée de fluxion, c'est-à-dire d'infinitésimale, poussait la correspondance jusqu'au dernier détail » (D'Alembert).

Mais l'hypothèse de structure ne se plie-t-elle pas plus difficilement à ces exigences ?

Schéma spatial, elle tolère cependant les raisonnements géométriques. Kékulé introduisit en chimie la représentation polygonale, nous savons aujourd'hui calculer les angles atomiques et prévoir les points possibles de soudure dans des chaînes qui tendent à se fermer en cycles. Pasteur imposa les représentations moléculaires à trois dimensions. Des déductions géométriques facilitent nos prévisions en stéréo-chimie. Ainsi, dans diverses voies se précise une chimie métrique.

Schéma moléculaire qui manie un univers formé d'infinitésimaux, elle est soumise aux prévisions d'un calcul de probabilité. On sait que cette science appliquée à l'hypothèse cinétique permet d'obtenir, par voie déductive, le principe d'évolution de Carnot-Clausius.

..

Convient-il d'aborder le délicat problème des rapports toujours contestés de l'hypothèse et du réel. L'hypothèse abstraite semble l'éviter puisqu'elle constate les faits, les relie entre eux, mais ne les explique pas. Cependant Duhem ne reconnaît-il pas en elle une « classification naturelle » ? Et qu'est-ce donc qu'une classification naturelle ? si ce n'est le sentiment indistinct d'une certaine réalité. « Lorsque le

zoologiste affirme qu'une classification est naturelle, il entend que des liens idéaux établis par la raison entre des conceptions abstraites correspondent à des rapports réels entre les êtres concrets où ces abstractions prennent corps ».

Les hypothèses de constitution posent plus brutalement la question. Le chimiste qui les manie chaque jour est amené peu à peu à leur supposer une certaine réalité. « Les atomes ne sont plus pour nous une fiction commode, il nous semble pour ainsi dire que nous les voyons depuis que nous savons les compter », concédait H. Poincaré sur la fin de sa vie. Est-ce pour échapper à cette emprise qu'un grand nombre d'expérimentateurs affirment ne faire que des « hypothèses de travail » ? « L'hypothèse de travail » prétend être féconde, elle ne se soucie pas d'être vraie, mais ne laisse-t-elle pas supposer que ce travail doit aboutir à une hypothèse mieux établie, moins modeste, une « hypothèse conjecture ».

* *

« Il est impossible », avoue Duhem, « de suivre la marche d'une des grandes théories de la physique, de la voir dérouler majestueusement à partir des premières hypothèses ses déductions régulières, de voir ses conséquences représenter dans les moindres détails, une foule de lois expérimentales sans être séduit par la beauté d'une semblable construction, sans éprouver vivement qu'une telle création de l'esprit humain est vraiment une œuvre d'art ».

Quelle ne sera point notre émotion lorsque nous nous apercevrons que de tels systèmes s'adaptent parfaitement à la vie.

Ne convient-il pas de chercher dans ce sentiment tout esthétique le suprême critère de la bonne hypothèse ? Est-il donc autre chose que l'intuition de la vérité et de la simplicité ?

CHAPITRE I

CINÉTIQUE DES RÉACTIONS

Le chimiste qui étudie une réaction ne connaît le plus souvent que ses termes extrêmes. Les intermédiaires lui échappent et, dans le plus grand nombre des cas, le mécanisme intime de la réaction, son mode évolutif, constituent un problème que nulle méthode connue ne saurait résoudre. La chimie physique s'est efforcée de combler cette lacune. Elle n'a que partiellement réussi. Il est souvent facile de suivre à des intervalles de temps réguliers, par des dosages en série, l'apparition des produits néoformés. On obtient ainsi une suite de chiffres dont l'accroissement plus ou moins rapide exprime sans doute la vitesse plus ou moins grande de la réaction, et dont les variations plus ou moins intenses traduisent ses aspects changeants et nuancés.

La longue série des chiffres qui représentent les quantités de produits formés en fonction des temps de réactions demande alors à être interprétée.

1° L'établissement de courbes, dont les abscisses représentent le temps et dont les ordonnées représen-

tent les quantités de corps obtenus, constituent une première étape qui, malgré sa simplicité, donne souvent d'utiles renseignements. C'est ainsi qu'il arrive fréquemment qu'une courbe devienne rapidement parallèle à la ligne des abscisses, et cela bien avant que toutes les molécules réagissant aient été transformées. Deux cas sont alors possible :

Tantôt le produit formé est détruit au fur et à mesure de sa formation pour donner naissance à un troisième produit. Tantôt un équilibre s'établit.

D'autres courbes, au contraire, évoluent vers un point dont l'ordonnée représente le maximum de substance néoformée.

De tels aspects des graphiques nous permettront d'opposer les albumines que nous étudierons et nous suffiront pour une première classification.

2° Les courbes établies demandent une traduction mathématique. Une formule est recherchée qui doit permettre les interpolations, et faciliter les extrapolations. La difficulté est beaucoup plus grande. Deux techniques peuvent être employées :

L'une consiste à rechercher par des méthodes uniquement mathématiques quelle formule s'adapte le mieux aux résultats trouvés. Elle est le plus souvent d'une pratique relativement simple. Elle aboutit à l'obtention d'une équation qui *à priori* n'a aucun sens physique. Son interprétation expérimentale est le plus souvent d'une difficulté insurmontable.

L'équation obtenue représente la totalité d'un phénomène. Pour connaître le mode de réalisation de ce phénomène à chaque instant de son exécution, il con-

vient de chercher la dérivée de l'équation qui l'exprime.

Pour comprendre nos résultats, nous avons essayé l'emploi d'une telle méthode. L'interprétation expérimentale reste malheureusement le plus souvent grossière et seulement approchée.

3° Mais une méthode meilleure s'offre à qui veut interpréter les résultats de son expérience. Purement déductive, elle part d'une hypothèse relative au mode de combinaison des molécules, par un raisonnement mathématique elle déduit l'équation qui doit s'appliquer à l'expérience, celle-ci se réalisant conformément à l'hypothèse formulée. Ces formules sont offertes toutes prêtes et le seul effort consiste à rechercher si oui ou non elles s'appliquent au cas considéré. Toutes comportent un facteur de proportionnalité entre la variable et la quantité fournie par l'expérience. L'équation est résolue le plus souvent par rapport à ce facteur ; l'application de cette équation aux données de l'expérience doit fournir un facteur de proportionnalité invariable qui constitue dès lors une véritable constante de vitesse de la réaction.

Ces équations sont nombreuses, nous nommerons seulement celles que nous avons appliquées à nos expériences.

a) Une première hypothèse imagine une réaction monomoléculaire, un corps A se transforme en un corps C, ou un corps A offert en quantité limitée réagit sur un corps B offert en quantité telle qu'elle peut être considérée comme constante. Nous écrivons que la vitesse d'une telle réaction est à chaque instant

proportionnelle à la quantité de matière restant à transformer, ce qui se traduit par l'équation différentielle :

$$\frac{dx}{dt} = K (a-x)$$

x étant la quantité de substance d'un corps A transformé à un instant t . ; a , la quantité de matière initiale, $a-x$, ce qui reste de non transformé au temps t . ; k , facteur de proportionnalité est une constante. C'est elle que l'on évalue. On obtient après intégration :

$$K = \frac{1}{t} \log \frac{a}{a-x}$$

b) Si l'on raisonne de même sur une réaction bimoléculaire, on écrit l'équation :

$$\frac{dx}{dt} = K (a-x) (b-x)$$

a , étant la quantité initiale d'un des corps réagissant ; b , celle de l'autre corps. Si ces quantités sont équivalentes, on a :

$$\frac{dx}{dt} = K (a-x)^2$$

l'intégration et le calcul du facteur K donne dans le premier cas :

$$K = \frac{1}{ta} \log \frac{b}{b-x}$$

et dans le second cas :

$$K = \frac{1}{t} \frac{x}{a (a-x)}$$

c) On peut en suivant des raisonnements toujours identiques établir la valeur de K par les réactions trimoléculaires :

$$K = \frac{1}{t} - \frac{1}{2} \left(\frac{1}{(a-x)^2} - \frac{1}{a^2} \right)$$

et quadrimoléculaires :

$$K = \frac{1}{t} - \frac{1}{3} \left(\frac{1}{(a-x)^3} - \frac{1}{a^3} \right)$$

Ainsi dans tous les cas, nous avons écrit que, à chaque instant de la réaction, la vitesse est proportionnelle à la quantité de corps restant à transformer. Par intégration, nous en avons déduit la valeur du facteur K. Celui-ci doit bien entendu rester constant s'il y a proportionnalité. Il prend le nom de constante de vitesse.

d) Si le phénomène qui transforme un corps A en un corps B est précédé d'un autre phénomène produisant A en quantité telle qu'il puisse être considéré comme constant, le second phénomène se réalise sur une quantité toujours renouvelée et doit s'exprimer par l'équation :

$$K = \frac{x}{t}$$

puisque chaque instant t, trouve une quantité de corps à transformer semblable à celle qu'avait trouvé l'instant précédent.

e) S'il s'est établi un équilibre traduisant une réaction réversible, la réaction totale sera la résultante de

deux autres et l'on devra écrire que la quantité néoformée à chaque instant est égale à la différence de deux réactions inverses. L'on n'aboutit pas à une constante de vitesse du phénomène envisagé, mais à la somme des deux constantes de vitesse des phénomènes inverses, l'on a par exemple l'équation de base :

$$\frac{dx}{dt} = K_1 (a-x) - K_2 x$$

qui après intégration donne

$$K_1 + K_2 = \frac{1}{t} \log_n \frac{Ka}{Ka - (K_1 + 1) x}$$

f) D'autres équations ont été proposées, telle celle de Bodenstein qui s'applique en milieu hétérogène. Nous ne l'étudierons pas, nos milieux étant constamment homogènes.

En possession de telles équations, il est facile d'en rechercher systématiquement l'adaptation aux résultats trouvés.

Il est bien rare qu'elles s'appliquent dans toute l'étendue du phénomène. On ne saurait se défendre d'un certain scepticisme en face des résultats obtenus par la plupart des auteurs. Il est bien difficile en effet de différencier les variations produites inévitablement par les erreurs d'expériences de celles qui proviennent d'une application imparfaite de la constante. Un exemple fera mieux comprendre la nature de cette difficulté.

La constante de premier ordre fut établie par Wilhelmy. Ce dernier l'appliqua à la réaction d'hydrolyse

du sucre de canne. On sait que celui-ci est d'extrogyre alors que le mélange glucose fructose qui résulte de son hydrolyse est lévogyre. La transformation peut être suivie au polarimètre. En utilisant l'acide nitrique comme catalyseur, Wilhelmy obtint des chiffres pour les diverses valeurs de K qui varient de 0,00132 à 0,00142. Il en conclut que la constante s'applique parfaitement. En fait cette même expérience reprise récemment par Colin et Chaudun, au moyen d'un polarimètre perfectionné, a fourni des chiffres qui pour une constante du premier ordre varient de 0,02975 à 0,3893, chiffres qui dépassent de beaucoup les erreurs d'expériences et les autorisent à penser qu'aucune constante ne s'applique exactement.

Nous avons essayé diverses constantes. Elles s'appliquent rarement dans toute la durée des expériences. Nous pensons qu'il ne faut point, lorsqu'une constante s'adapte, en conclure immédiatement à la stricte réalisation du mécanisme posé à *a priori* dans l'hypothèse de base de cette constante, mais qu'il convient plutôt de trouver là seulement une manière précise de grouper les faits sans les interpréter.

CHAPITRE II

CONSTITUTION DES ALBUMINOÏDES UTILISÉES DANS NOTRE ÉTUDE

Nous pouvons seulement en une analyse rapide examiner ici les hypothèses émises sur la constitution des protéines ¹. Nous nous attacherons plutôt à la recherche des caractéristiques de chacune des protéines que nous aurons à étudier, espérant trouver en cette revue l'explication des particularités que nous pourrions déceler par nos expériences.

Il est un ensemble de notions, aujourd'hui classiques, qui nous serviront de fil conducteur pour l'interprétation de nos résultats. Il semble donc légitime de les résumer en quelques mots.

A) On sait que les produits élémentaires de l'hydrolyse des protéines sont représentés par les acides aminés. Or chaque albumine se trouve caractérisée par un ensemble spécifique d'acides-amino.

1. On les trouve exposés dans diverses études :

A. BLANCHETIÈRE, l'Évolution de nos connaissances sur la structure chimique des matières protéiques (*Bull. Soc. Chim. Biol.*, T. VII, 1925, p. 218-330).

A. MOREL, Congrès de Lyon pour l'avancement des Sciences, 1926.

Il s'en suit que l'étude d'une protéine doit commencer par un dosage minutieux des amino-acides libérés par son hydrolyse.

B) Ces amino-acides se réunissent entre eux, selon des modes encore discutés. Cependant, nous connaissons déjà les principaux types de groupement et nous entrevoyons le moment où l'on pourra pour les albumines pures apprécier la part revenant à chacun d'eux.

1° Le plus ancien et le mieux établi de ces modes de groupement est l'enchaînement peptidique. Les amino-acides sont liés en longues chaînes par la réaction de la fonction acide de l'un d'eux sur la fonction amine du suivant. Cette hypothèse repose sur une base solide. Fischer a réalisé par ses admirables synthèses de semblables chaînes d'acides aminés. Il obtint ainsi des corps qui à beaucoup de point de vue peuvent être rapprochés des albumines naturelles. Ces faits sont aujourd'hui classiques.

2° E. Fischer, puis E. Abderhalden ont envisagé la possibilité d'un autre mode de groupements : l'enchaînement dicétopipérazique. Deux amino-acides réagissant par deux fois l'un sur l'autre. La fonction amine de l'un se copulant toujours à la fonction acide de l'autre, il résulte de cette double réaction un hétérocycle que Maillard² désigne sous le nom de cyclopeptides. La réalité de tels groupements est encore contestée, malgré une défense extrêmement vigoureuse d'Abderhalden. On peut cependant en faveur d'une telle hypothèse présenter un certain nombre d'arguments.

2. L.-C. MAILLARD, *Genèse des matières protéiques et des matières humiques*. Paris, Masson, 1913.

d'une très grande valeur. Un des plus convaincant est la détection dans les protéines d'un certain nombre de réactions colorées qui pour Abderhalden seraient caractéristiques des seuls cyclopeptides. Le dosage des cyclopeptides peut être fait par isolement de ces corps depuis les produits d'hydrolyse. Mais il s'introduit dans cette technique de telles causes d'erreurs, que les chiffres fournis par les différents expérimentateurs présentent entre eux des différences considérables. Il est d'ailleurs bien difficile de faire la part des cyclopeptides préexistant dans la molécule et de ceux qui se sont formés secondairement au cours de l'hydrolyse.

Plus exacte, encore que d'un maniement difficile, est la méthode inspirée par Blanchetière ³, méthode reposant sur une réaction de précipitation des cyclopeptides, elle a fourni à A. Morel et Siméon ⁴ des résultats sur lesquels nous reviendrons.

3° Enfin, il est une troisième hypothèse due à Troensgaard, qui s'oppose en quelque sorte aux précédentes.

Pour cet auteur, les amino-acides ne préexistent pas dans la molécule. Celle-ci est formée de noyaux hétéro-cycliques qui par hydrolyse produisent artificiellement des acides aminés.

Les protéines sont essentiellement formées par un noyau benzénique auquel sont attachés trois noyaux d'oxy-pyrrolo.

3. A. BLANCHETIÈRE, Séparation et dosage des 2-5 diacipipérazines en présence des amino-acides et des peptides (*Bull. Soc. Chim. de France*, p. 101-110, janvier 1927, 4^e série, T. XLI, n° 1).

4. A. SIMÉON, Contribution à l'étude chimique des protides, 1928, Lyon (*Thèse de Pharmacien supérieur*).

4° Ajoutons enfin qu'il s'agit là de groupements essentiels réunissant entre eux les amino-acides du bloc moléculaire, mais que chaque fonction du radical des acides aminés peut être le point de liaison d'un autre amino-acide selon un mode original.

Une protéine étant offerte à l'étude chimique, le problème présente donc un double aspect.

1° Il convient de déterminer aussi exactement que possible les acides aminés qui constituent la molécule.

2° Il faut ensuite s'efforcer de déterminer comment sont unis entre eux ces amino-acides.

La difficulté est grande pour résoudre le second de ces problèmes et nous devons le plus souvent nous contenter d'indications imprécises.

Il semble qu'il soit possible d'établir entre les divers protides une première distinction, d'ordre physiologique.

I. — Un premier groupe comporte des albumines qui sont utilisées comme réserve par les organismes en voie de formation, il s'agit essentiellement de l'ovalbumine, de la caséine et de la clupéovine.

1° Etude de l'ovalbumine.

a) L'analyse élémentaire de l'ovalbumine fournit les chiffres suivants :

	C	H	N	S	O
Hofmeister ⁵	53,28	7,26	15,0	1,18	23,28
Schulz ⁶	52,26	7,4	15,19	1,23	23,92
Bondzynsky u. Zoja ⁷	52,07	6,95	15,11	1,614	24,26
— —	52,44	7,26	15,58	1,7	23,02
Hopkins ⁸	52,75	7,12	15,49	1,57	23,13
Osborne u. Campbell ⁹ ..	52,75	7,10	15,51	1,62	22,90
Langstein ¹⁰	52,46	7,19	15,29	1,34	23,72

b) L'étude de ses produits d'hydrolyse a donné d'après L. Hugounenq ¹¹ :

Alanine	8,1
Leucine	7,1
Acide glutamique	8
Acide aspartique	1,5
Tyrosine	1,1
Phénylalanine	4,4
Proline	2,25
Cystine	0,2
Glycocolle	
Lysine	2,3

En somme, l'ovalbumine se caractérise essentiellement par son absence de glycocolle et par sa teneur élevée en alanine, leucine et acide glutamique.

5. F. HOFMEISTER, *Zeitschrift für physiolog. Chemie* 16, 187 (1891), 24, 159 (1897).

6. F.-N. SCHULZ, *Ibid.* 25, 16 (1898).

7. St. BONDZYNsky u. L. ZOJA, *Ibid.* 19, 1 (1893).

8. F.-G. HOPKINS, *Journ. of Physiol.* 25, 306 (1900).

9. T.-B. OSBORNE and F.-G. CAMPBELL, *Journ. Americ. Chem. Soc.* 21, 477 (1899), 22, 422 (1900).

10. L. LANGSTEIN, *Über die gerinnbaren Stoffe des Eierklars, Hofmeisters Beitr.* 1, 83 (1901).

11. L. HUGOUnenq, *Précis de Chimie Physiologique et Pathologique*. Edit. Testut (1921).

2° Etude de la clupéovine de l'œuf de hareng (*clupea harengus*). De l'étude de L. Hugounenq ¹² il résulte que :

a) Sa composition est la suivante :

C : 53,68 % ; H : 7,38 % ; N : 14,64 %
S : 0,4 % ; O : 23,9 %

b) Son hydrolyse a donné les résultats suivants :

Leucine : 21.2 % ; Tyrosine : 1 % ; Histidine : 0,4 %
Lysine : 2 % ; Arginine : 2,7 %

On voit là encore l'énorme quantité de leucine trouvée.

3° Etude de la caséine.

a) Sa composition élémentaire est la suivante :

	C	H	N	P	S	O
Hammarsten ¹³ .	52,96	7,05	15,65	0,848	0,758	
Tangel ¹⁴	52,69	6,81	15,65	0,877	0,832	23,14
Burow ¹⁵	52,825	7,095	15,64	0,808	0,725	22,906
Van Slyke et Bosworth ¹⁶ ..	53,5	7,13	15,8	0,710	0,720	

b) Nous empruntons le tableau au chapitre : « The Organic Chemistry of casein », rédigé par R. A. Gortner dans le livre de E. Sutermeister.

12. L. HUGOUNENQ, *Comptes rendus, Acad. des Sciences*, 25 avril 1904.

13. O. HAMMARSTEN, Zur Kenntniss der nucleoproteide. *Zeitschr. für physiol. chem.*, 1894, 19, p. 19.

14. TANGL, Die elementare Zusammensetzung der verschiedenen Kaseine. *Pflügers arch.* 1908, 121, 534.

15. BUROW, Beiträge zur Entscheidung der Frage ob die Kaseine verschiedener Tierarten identisch sind ? *Thèse, Bâle*, 1905.

16. L. L. VAN SLYKE et A. W. BOSWORTH, Method for preparing ash free casein and Paracasein. *Journ. of biol. chem.* 1913, 14, p. 203.

Glycine	0,45
Alanine	1,85
Valine	7,93
Leucine	7,92
Iso-leucine	1,43
Proline	8,70
Phénylalanine	3,88
Tyrosine	5,70
Acide glutamique	21,77
Acide aspartique	4,10
Acide Hydroxyglutamique	10,50
Serine	0,45
Hydroxy-proline	0,23
Tryptophane	1,70
Cystine	0,02
Arginine	4,84
Histidine	3,39
Lysine	7,72
Acide diaminotrihydroxy-dodé- canoïque	0,75
Acide-aminé contenant du soufre	0,40
Ammoniaque	1,61
Phosphore	0,85
Soufre	0,76

c) L'étude de l'azote non carbaminé a fourni à Morel et Siméon les résultats suivants :

Hydrolyse à 170° 6 heures 20 fois le poids d'acide	Hydrolyse à 170° 4 heures 20 fois le poids d'acide	Hydrolyse à 170° 4 heures 12 fois le poids d'acide
27,4 %.	28,3 %.	40 %.

Cette albumine ne renferme donc qu'une quantité négligeable de glycocolle, comme les deux précédentes, la leucine entre largement dans sa constitution, enfin elle semble se caractériser par sa teneur élevée en amino-acides, tels que la tyrosine ou l'acide hydroxy-glutamique qui introduisent dans la molécule des fonctions nouvelles, et qui par suite de leur importance quantitative peuvent donner aux hydrolyses de la caséine une allure un peu spéciale.

On a retiré de la caséine un certain nombre de polypeptides parmi lesquels il convient de citer l'alanyl-leucine décelée par Abderhalden dans hydrolyse par l'acide sulfurique à 5 %.

Enfin, Abderhalden ¹⁷ a retiré de la caséine un certain nombre de cyclopeptides : la cycloleucylleucine, la cycloisoleucylvaline, la cyclophénylalanylalanine, la cyclotyrosyltyrosine, le cyclotryptophanyltryptophane et la cyclo-oxy-prolyl-oxy-proline.

II. — Un deuxième groupe est formé par des albumines qui entrent dans la constitution d'éléments anatomiques adultes. Elles semblent avoir un rôle essentiellement plastique.

Il convient de ranger dans ce groupe, la gélatine, qui est une osséine à peine modifiée, et la fibroïne.

1° Etude de la gélatine.

17. ABDERHALDEN, *Zeit. Physiol. Chem.* (1923), CXXVIII, 119.
ABDERHALDEN et C. FUNK, *Zeit. Physiol. Chem.* (1907), LIII, 19.
S. FRANKEL et E. FIELDSBERG, *Biochem. Zeit.* (1921), CXX, 218-229.
S. FRANKEL et K. GALLIA, *Biochem. Zeit.* (1922), CXXXIV, 308-821.
S. FRANKEL et P. JELLINEK, *Biochem. Zeit.* (1922), CXXX, 592-603.

a) La composition élémentaire de l'osséine d'après L. Hugounenq est la suivante :

C : 50 ; H : 7 ; N : 18 ; S : 0,7

b) On sait que H. D. Dakin ¹⁸, grâce à une technique personnelle, a récemment fourni une étude très complète des produits d'hydrolyse de la gélatine, en voici les résultats :

Glycocolle	25,5
Proline	9,5
Oxyproline	14,1
Leucine	7,1
Valine	1
Alanine	8,7
Acide aspartique	5,8
Phénylalanine	1,4
Sérine	0,4
Histidine	0,9
Arginine	8,2
Lysine	5,9

La quantité de glycocolle est donc très élevée ; à côté de cet amino-acide, il convient de noter la place importante faite à l'oxyproline et à la proline.

c) On a pu retirer des hydrolyses partielles un certain nombre de cyclopeptides : la cyclo-prolyl-glycine ¹⁹, l'oxyprolyl-proline ²⁰.

2° Etude de la fibroïne.

18. H. D. DAKIN, Amino-acides of gelatine. *The Journ. of biol. chem.* 1903, T. 44, p. 499-529.

19. P. A. LEVENE, *J. Biol. Chem.* 1918, 36, p. 73.

20. H. D. DAKIN, *Journ. Biol. Chem.* (1920), XLIV, 499-529.

a) L'étude des produits d'hydrolyse a fourni des résultats un peu différents à E. Fischer ²¹ et à E. Abderhalden.

	Fischer	Abderhalden
Glycocolle	36	40,5
Alanine	21	25
Leucine	1,15	2,5
Phénylalanine	1,15	1,5
Serine	1,6	1,8
Proline		1
Tyrosine	10,5	11
Arginine		1,5
Lysine		0,85
Histidine		0,75

b) Par hydrolyse partielle de la fibroïne, Abderhalden ²² a pu obtenir une substance ressemblant aux peptones qui est un tétrapeptide donnant par hydrolyse deux molécules de glycocolle, une molécule d'alanine, une molécule de tyrosine.

c) Abderhalden ²³ a pu isoler six anhydrides de la fibroïne de la soie : la cyclo-glycyl-alanine, la cyclo-d-

21. E. FISCHER et SKITA, *z. f. ph. chem.* (1901), T. 33, p. 177.

22. E. ABDERHALDEN, *Ber chem. ges.*, 40, p. 3544.

23. E. ABDERHALDEN, *Zeit. Physiol. Chem.* (1912), LXXX, 207-213.

E. ABDERHALDEN, *Pflüger's arch.* (1922), CXCV, 199.

E. ABDERHALDEN et K. KAUSCH, *Zeit. Physiol. Chem.* (1912), LXXVIII, 115-127.

E. ABDERHALDEN et E. KOMM, *Zeit. Physiol. Chem.* (1924), CXXXIV, 113-128.

E. ABDERHALDEN et E. KOMM, *Zeit. Physiol. Chem.* (1924), CXXXVI, 134-146.

E. ABDERHALDEN et W. STIX, *Zeit Physiol. Chem.* (1923), CXXIX, 143-156.

E. FISCHER, *Untersuchungen über aminosäuren, polypeptide*

ananyl-l-sérine, la cyclo hydroxyltyrosine, la tyrosyl-cyclo-glycyl-alanyl-glycine, la cycloglycyl-l-leucine, la cyclo-glycyl-l-tyrosine.

d) L'étude de la constitution de la fibroïne de soie a pu être abordée par l'examen de spectrogrammes des rayons de Roentgen. Brill ²⁴ a montré que la soie contient un corps élémentaire qu'il nomme cristal de soie. Après cet examen, Brill envisage le cristal de soie comme pouvant être formé d'un des corps suivants : polypeptides : glycyl-alanine et alanylglycine, cycloglycyl-alanine, et surtout produits de polymérisation des précédents.

Plus récemment Brill ²⁵ ajoute que cette contexture peut encore être celle des corps « hauts moléculaires » de Bergmann. Or Bergmann désigne par cette appellation des molécules de synthèses obtenues par polymérisation des cyclopeptides et auxquelles il attribue la formule :



Leur hydrolyse livre des tétrapeptides et l'on peut se demander s'il ne s'agit pas de cycles comportant un nombre d'amino-acides supérieur à deux.

Dans l'ensemble des protéines, la fibroïne semble donc se singulariser par une contexture qui est peut-être à rapprocher de celle des « hautes molécules » de Bergmann.

und proteine, 1, 1899-1906 ; II, 1907-1919 ; Springer, Berlin.

W. S. ŠADIKOF, *Biochem. Zeit.*, CXLIII, 504-511 (1923).

W. S. ŠADIKOF et D. N. ZELINSKY, *Biochem. Zeit.* (1923), CXXXVI, 241-249.

24. BRILL, *Annalen* : 434 (1923), p. 204.

25. BRILL, *Annalen*, 446, p. 307 (1926).

III. — Il convient d'isoler une albumine végétale : l'édestine dont nous avons poursuivi l'étude. Elle nous a paru spécialement intéressante puisqu'elle peut être obtenue cristallisée.

a) L'étude de sa composition élémentaire a donné les résultats suivants :

	C	H	N	S	O
Ritthausen ²⁶	50,92	6,91	18,71	0,82	22,64
Chittenden and Mendel ²⁷ ..	51,63	6,9	18,78	0,9	21,79
Osborne ²⁸	51,27	6,85	18,76	0,91	22,22
Abderhalden ²⁹	51,21	8,87	18,64	0,91	22,37
Hausmann ³⁰			18,53		

b) L'étude des amino-acides libérés par hydrolyse a fourni la liste suivante :

Glycocolle	3,8
Alanine	3,6
Leucine	22,7
Phénylalanine	2,4
Acide pyrrolidine carbonique	1,7
Acide glutamique	6,3
Acide aspartique	4,25
Acide oxypyrrolidine carbonique	2
Cystine	0,25
Serine	0,35
Tyrosine	2,13
Lysine	1,65
Histidine	2,19

26. H. RITTHAUSEN, *Journ. f. prakt. Chem.* (2) 23, p. 412 (1881) ; (2) 25, 130 (1882).

27. R. H. CHITTENDEN and L. B. MENDEL, *Journ. of Physiol.* 17, p. 48 (1894).

28. T. B. OSBORNE, *Amer. chem. Journ.* 14, Nr. 8 (1893).

29. E. ABDERHALDEN, *Zeitch. für physiol. chem.* 37, p. 409 (1903).

30. W. HAUSMANN, *Zeitch. für physiol. chem.* 29, p. 136 (1900).

Arginine	14,17
Tryptophane	
Cystine	

IV. — Nous avons enfin étudié une protamine, la clupéine de harengs, on sait : que Derselbe et F. Kutscher ³¹ ont trouvé 82,2 % d'arginine, ils ont noté en outre la présence de serine et l'absence de cystine, de tyrosine, de lysine et d'histidine, il s'agit donc d'une albumine essentiellement formée de diamino-acides.

31. DERSELBE et F. KUTSCHER, *Zeit. fur physiol. chem.* 1900, 31, p. 165.

CHAPITRE III

PRÉPARATIONS DES ALBUMINES UTILISÉES

Nous nous sommes efforcés d'obtenir des produits d'une grande pureté. Pour cela, nous avons appliqué les techniques suivantes :

1° *Préparation de la caséine.* — Nous avons suivi la technique classique de Béchamp.

Le lait frais est additionné de 2 gr. 9 d'acide acétique par litre. Le précipité est lavé, mis en suspension dans l'eau, puis redissout dans un léger excès de carbonate d'ammoniaque. La liqueur filtrée est reprecipitée par l'acide acétique. On lave et le précipité est repris 4 fois par le carbonate d'ammoniaque. On lave à l'eau pure et on sèche.

En outre nous avons dégraissé le produit obtenu par l'éther pendant plusieurs heures au moyen de l'appareil de Kumagavva Suto. Nous obtenions un très beau produit blanc, ne donnant plus de résidu appréciable après calcination. Le dosage d'azote par la méthode de Dumas nous a donné : $N \% = 15,50$.

Nous avons, au moyen d'une solution d'acide chlorhydrique 1,122 %, comparé la marche de l'hydrolyse de notre produit avec celle d'une caséine préparée par

M. le Professeur Porcher qui avait aimablement mis quelques grammes de ce produit à notre disposition. La caséine préparée selon la technique de Ch. Porcher ³² peut être considérée comme extrêmement pure et peut en quelque sorte être prise comme test.

Les résultats de deux hydrolyses pratiquées, l'une avec notre caséine, l'autre avec de la caséine préparée selon la technique de Porcher, sont en tout point comparables.

2° *Préparation de l'ovalbumine.* — Nous avons utilisé une ovalbumine très pure du commerce, à laquelle nous avons fait subir une purification ; après avoir été réduite au mortier d'agate en une fine poudre, l'ovalbumine était séchée dans le vide pendant 24 heures, puis dégraissée à l'éther au moyen de l'appareil de Kumagavva Suto pendant plusieurs heures.

Le dosage d'azote par la méthode de Kjeldahl, nous a donné : N = 15,05 %.

3° *Préparation de l'édestine.* — Nous avons suivi la méthode d'Osborne ³³ revue par Chittenden ^{33 bis}.

La méthode qui donne les meilleurs résultats est celle que recommande Osborne.

1 kg de grains de chanvre broyés est traité par 4 litres de solution de NaCl à 5 % et chauffé à 60° pendant 1 à 2 h. en remuant souvent. Le mélange est alors rapidement filtré sur étoffe, puis sur papier. On obtient

32. Ch. PORCHER, Le lait au point de vue colloïdal. Lyon « Le lait ». *Thèse de Sciences de Lyon*, 1928-1929, p. 160.

33. OSBORNE B. THOMAS, *Crystallised vegetable proteids in American chemical Journal*, 1892, 14, p. 662-689.

33 bis. CHITTENDEN R. H. and LAFAYETTE, B. NENDEL Ph. D. On the proteolyses of crystallised globulin. *In the Journal of physiology*, 1894, 95, 17, p. 48-80.

un liquide jaune brun clair qui commence rapidement à se troubler par précipitation de la globuline. On laisse 24 heures à 20°, 25°, et le précipité lourd, légèrement coloré, est composé de cristaux. On filtre, lave avec une solution saline diluée, à l'eau et enfin à l'alcool dilué, jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de chlorure de sodium. On augmente alors la force de l'alcool jusqu'à l'alcool absolu, puis on lave à l'éther. On sèche dans un courant d'air.

Nous avons obtenu une albumine qui au microscope apparaissait comme entièrement cristallisée.

Le dosage de l'azote total (Kjeldahl) a donné : N = 18,5 %.

4° *Préparation de la clupéine et de la clupéovine.* — Nous avons prélevé sur 10 kgs de harengs frais d'une part les testicules, qui nous ont servi pour la préparation de la clupéine d'autre part les ovaires que nous avons utilisés pour la clupéovine dont nous donnerons la préparation ensuite.

La clupéine ³⁴ : 100 gr. de substance sont traités par 500 cc. d'H²SO⁴ à 1 % dans une machine à agiter pendant 1/4 d'heure. On essore sur un linge et on répète 3 fois l'opération avec la même quantité d'SO⁴H². Le filtrat est précipité par 3 volumes d'alcool, abandonné pendant 24 heures, décanté. On essore ensuite le précipité de sulfate de protamine.

Purification : Le précipité de sulfate est redissous dans l'eau, la liqueur est neutralisée par NH³ et préci-

34. CONHEIM O., *Chemie der Eiweisskörper*.

KOSSEL A., *Ueber die basischen stoffe des zellkerns*, in *Zeitschrift für physiologische chemie* 1896, 97, 22 p. 176-187.

pitée de nouveau par l'alcool (3 volumes). En répétant plusieurs fois cette manipulation, on obtient un sel blanc, très pur, qui se dissout dans l'eau, en donnant une solution incolore.

Clupéovine ³⁵ : La technique d'extraction en a été fixée par L. Hugounenq :

« L'albumine est isolée en épuisant la matière par les divers dissolvants : le résidu est dissous dans la soude très diluée et reprecipité par l'acide chlorhydrique. Ce traitement est renouvelé plusieurs fois ; finalement, la matière est purifiée par dialyse et par précipitation à l'aide de l'alcool ».

Le dosage de l'azote total (Kjeldahl) a donné : 14,35 %.

5° *Préparation de la fibroïne de la soie* ³⁶. — La fibroïne de soie utilisée fut préparée au moyen de déchets de soie qui furent traités par 20 fois leur poids d'eau à l'autoclave à 115° pendant 3 heures, l'eau étant renouvelée 3 fois. Cette préparation se fait dans un pot en grès afin que l'alcalinité du contenant ne joue pas le rôle d'agent d'hydrolyse.

6° *La gélatine* employée provient du commerce. Elle a été purifiée par lavage des feuilles coupées en fines lamelles au moyen d'éther puis elle a été desséchée dans le vide.

L'azote total par la méthode de Kjeldahl a donné : N = 17,8 %.

35. HUGOUNENQ L., Sur une albumine extraite des œufs de poissons. Chimie comparée des productions sexuelles de la même espèce. C. R. Académie des Sciences, 25 avril 1904.

36. Tous les travaux concernant la fibroïne de la soie ont été réalisés en collaboration avec M. le Professeur Morel.

CHAPITRE IV

ÉTUDE DE LA CINÉTIQUE DE L'HYDROLYSE DES PROTEINES

L'étude de l'hydrolyse des protéines fut déjà poursuivie en Allemagne et nous aurons au cours de ce chapitre l'occasion de discuter les résultats antérieurement obtenus. Mais il semble qu'aucune étude systématique n'en ait encore été faite. Nous nous sommes efforcés de fixer un certain nombre des variables du problème pour n'en conserver qu'une seule, l'acidité du milieu.

Nous avons employé des acidités croissantes et assez rapprochées que nous indiquerons dans nos protocoles d'expérience. Par contre, nous n'avons utilisé que le seul acide chlorhydrique qui possédant un seul hydrogène acide permet des calculs plus faciles.

La dilution de nos solutions a toujours été la même. Le liquide d'hydrolyse étant toujours égal à vingt fois la quantité d'albumine utilisée.

Nous avons employé le plus souvent 10 gr. de protéine et 200 gr. de liquide d'hydrolyse.

Des prélèvements ont été opérés à des intervalles de

temps plus ou moins espacés, suivant l'allure plus ou moins rapide du phénomène étudié.

Les hydrolyses ont été pratiquées dans de grands ballons de deux litres, munis d'un bon réfrigérant ascendant du type Vigreux. Le ballon était pesé avant chaque temps de chauffe, il l'était à nouveau après l'ébullition de quelques heures qui séparaient deux dosages. Les pertes subies malgré le réfrigérant étaient alors compensées par addition de la quantité nécessaire d'eau distillée, le plus souvent aucune perte n'était trouvée. Les prises nécessaires aux dosages étaient aussi minimales que possible (généralement 3 à 4 cm³), elles étaient opérées sur un milieu parfaitement homogénéisé par agitation. La quantité globale de liquide était diminuée de quelques centimètres cubes, mais le pourcentage en azote dans le liquide restait le même pendant toute la durée de l'hydrolyse.

Nos dosages étaient opérés par deux méthodes : la méthode de Sørensen et la méthode de Van Slyke. Nous en publierons séparément les résultats :

DOSAGES DES GROUPEMENTS NH^2 PAR LA MÉTHODE DE SORENSEN

Technique utilisée :

Schiff a montré que les groupements aminés des amino-acides sont captés par le formol, qui libère ainsi les carboxyles de ces amino-acides. Ceux-ci peuvent dès lors être dosés par acidimétrie. Sorensen s'est efforcé de transformer cette réaction en méthode quantitative de dosage des carboxyles libérés et par suite des

groupements NH^2 . La technique de cette opération telle que nous l'avons pratiquée est la suivante : le liquide étudié est neutralisé en présence de phénol-phtaléine, une quantité suffisante de formol est alors ajoutée qui libère les groupements acides. La neutralité est de nouveau obtenue par une addition de soude titrée. Qu'il nous suffise de signaler un certain nombre de détails techniques que nous nous sommes efforcés de respecter.

1° Nous avons réalisé nos dosages en prenant comme base la teinte rose faible de la phénol-phtaléine, elle correspond à un $\text{P}_H = 8,3, 8,4$ alors que le rose net correspond à un $\text{P}_H = 8,7$ ou $8,8$ et le rouge à un $\text{P}_H = 9,1$.

Chaque dosage était d'ailleurs précédé de l'établissement d'un liquide de référence qui permettait après chaque addition de formol de revenir exactement à la teinte que présentait le liquide avant cette addition.

Pour cela, un verre semblable à ceux qui servaient aux dosages recevait une quantité d'eau égale à la quantité de liquide à titrer, il était additionné de quelques gouttes d'une solution de phénol-phtaléine et de la quantité nécessaire de soude $\text{N}/20$ pour produire la coloration rose léger étalon. Les verres servant aux dosages étaient posés sur une plaque de plâtre formant un fond blanc, sur lequel les moindres modifications de couleur étaient facilement visibles.

2° Les précautions habituelles étaient prises, la neutralité du formol était vérifiée avant chaque dosage. Nous l'ajustions de telle sorte qu'une goutte de solu;

tion N/20 suffisait à lui communiquer une teinte rose léger.

3° La soude utilisée pour obtenir la neutralité était de la soude N/20.

4° Nous faisons le plus souvent deux dosages vérificateurs pour chaque série. Nous avons d'ailleurs calculé les erreurs possibles en reproduisant plusieurs dosages successifs sur un même liquide et en comparant les résultats. L'erreur possible ne dépasse pas 5 % pour deux dosages pratiqués le même jour, c'est-à-dire avec une même solution de formol, et 8 % pour deux dosages réalisés à plusieurs jours de distance, c'est-à-dire avec deux solutions différentes de formol.

5° Les dosages étaient pratiqués sur des quantités de liquide nécessitant toujours une quantité de soude N/20 variant de 5 à 8 cc.

Les liquides trop foncés dont la coloration aurait pu compromettre la sensibilité du dosage étaient dilués au moyen d'eau distillée.

Résultats obtenus :

Nous publierons nos résultats en groupant les albumines utilisées en série d'hydrolyse, chacune étant caractérisée par l'acidité utilisée. Celle-ci est calculée en HCl par 100 gr. de liquide d'hydrolyse.

La première colonne exprime les temps d'hydrolyse en heure TH ou en minutes TM.

La deuxième colonne donne la quantité d'azote libéré à l'instant considéré rapporté à 100 gr. de l'albumine étudiée.

Les autres colonnes représentent les résultats du cal-

cul de certaines constantes sur lesquelles nous aurons à revenir.

DOSAGE PAR LA MÉTHODE SORENSEN

Acidité en HCl : 0,374 %

	TH	N ‰	$k = \frac{x}{\sqrt{t}}$	$k = \frac{1}{t} \text{Log}_{10} \frac{a^{39}}{(a-x)}$
<i>Gélatine</i>	4	0,84	0,42	
	8	1,04	0,36	
	12	1,26	0,36	
	19	1,4		
	27	1,33		
<i>Ovalbumine</i> ...	2	0,56	0,39	
	6 1/4	0,91	0,36	
	9 1/4	1,05	0,34	
	17 1/2	1,05		
<i>Caséine</i>	4	0,84	0,42	
	8	1,05	0,37	
	12	1,05		
<i>Fibroïne</i>	10 3/4	1,68	0,51	0,010
	15 3/4	2,10	0,53	0,0089
	22	3,71	0,78	0,011
	31	4,69	0,84	0,011

Acidité en HCl : 0,748 %

<i>Gélatine</i>	2 1/2	0,84	0,53
	9	1,68	0,56
	13	1,89	0,52
	14 1/2	2,03	0,54

39. Nous n'avons indiqué que les chiffres significatifs.

	TH	N ‰	$k = \frac{x}{\sqrt{t}}$	$k = \frac{1}{t} \text{Log}_n \frac{a}{(a-\lambda)}$
<i>Ovalbumine</i> ...	3	0,91	0,52	
	7	1,54	0,58	
	11	1,75	0,52	
	15 1/4	1,96	0,50	
	18 1/4	2,17	0,51	
	22 1/4	1,96		

Acidité en HCl ; 1,122 ‰

Gélatine

(1 ^{re} Observ.) ..	2	1,4	0,99
	6	2	0,81
	10 1/2	2,58	0,80
	14 1/2	2,9	0,77
	19	3,2	0,73
	21 1/2	3,3	

Gélatine

(2 ^e Observ.) ..	4	1,96	0,98
	8	2,66	0,94
	12	3,36	0,97
	19	3,56	0,81
	27	3,56	

Ovalbumine

(1 ^{re} Observ.) ..	4	1,4	0,70
	8	1,68	0,59
	12	1,96	0,56
	16	2,30	0,57

	TH	N %	$k = \frac{x}{\sqrt{t}}$	$k = \frac{1}{t} \text{Log}_n \frac{a}{(a-x)}$
<i>Ovalbumine</i>				
(2° Observ.) —	3	1,19	0,68	
	6 1/2	1,54	0,60	
	9	1,89	0,63	
	13	2,44	0,67	
<i>Caséine</i>	4	1,89	0,945	
	8	2,45	0,86	
	12	2,59	0,74	
	15 3/4	2,73	0,70	
<i>Fibroïne</i>	9	2,66	0,88	0,0202
	10	3,01	0,95	0,0208
	15	3,5	0,90	0,0165
	21	4,2	0,91	0,0145
	30	5,32	0,97	0,0150

Acidité en HCl : 1,496 %

<i>Gélatine</i>	1 1/2	1,82	1,49	
	3	2,17	1,24	
	5	2,85	1,28	
	7	3,08	1,15	
	10	3,29	1,04	
	12	3,42	0,98	
	15	3,71	0,96	
	16	3,85	0,96	
	25	4,41		
<i>Ovalbumine</i> ..	3	1,56	0,90	0,02023
	7	2,17	0,82	0,0123

TH	N ° °	$k = \frac{x}{\sqrt{t}}$	$k = \frac{1}{t} \text{Log}_n \frac{a}{(a-x)}$
11	2,8	0,84	0,0106
14 3/4	3,08	0,81	0,00705
18 1/4	3,36	0,79	
22 1/4	3,42	0,70	

Acidité en HCl : 1,87 %

<i>Gélatine</i>	4 1/2	3,36	1,58
	8 1/2	4,4	1,5
	13	5,1	1,41
	16	5,38	1,34
	20	5,8	1,29
	27	6,58	1,26
	40	6,5	
<i>Ovalbumine</i> ..	4	1,89	0,945
	8 1/4	2,38	0,83
	11 1/2	3,28	0,96
	16	3,42	0,855
	19	3,36	0,77
<i>Caséine</i>	3	2,7	1,55
	6	3,36	1,41
	10 1/4	4,34	1,35
	13 1/2	4,69	1,23
	21 1/2	5,1	1,11
	31 1/2	5,8	
	40 1/2	5,8	
<i>Edestine</i>	0,17	0,98	
	0,33	1,33	

	TH	$N = \frac{x}{\sqrt{t}}$	$k = \frac{1}{t} \log \frac{a}{(a-x)}$	
	0,50	1,4	5,6	
	0,66	1,4		
	1	2,1	2,1	
	3	2,67	1,53	
	8	3,5	1,24	
	13	4,69	1,30	
	18	5,2	1,22	
	22	5,8	1,23	
	27	6,16	1,18	
	31	6,5	1,18	
<i>Clupéovine</i>	4	1,75	0,875	
	8 1/2	2,59	0,82	
	12	2,8	0,80	
	16 1/4	3,08	0,77	
	20 1/4	3,57	0,80	
	29 1/4	4,06	0,75	
	37	4,27	0,70	
	47	4,76	0,70	
	57	5		
	65	4,96		
	71	4,96		
<i>Fibroïne</i>	3 1/4	2,030	1,127	0,18
	5 1/4	2,73	1,19	0,035
	7 1/4	4,41	1,63	0,044
	10 1/2	5,32	1,63	0,037
	15	6,65	1,71	0,036
	19	7	1,60	0,030

TH	N ‰	$K = \frac{x}{\sqrt{t}}$	$K = \frac{1}{t} \log_n \frac{a}{(a-x)}$
22 1/4	7,8	1,64	0,030
26 1/4	8,75	1,71	0,030
44	10,78	1,62	

Acidité en HCl : 2,244 ‰

<i>Gélatine</i>	2 1/2	1,9	1,25
	9 1/2	4	1,29
	13,5	5,1	1,37
	19	5,7	1,31
	21	5,7	

Ovalbumine

(1 ^{re} Observ.) . .	2 1/4	1,82	1,21
	7 1/4	2,87	1,06
	11	3,46	1,04
	15	3,92	1,01
	23	4,2	0,87

Ovalbumine

(2 ^e Observ.) . . .	4	2,1	1,05	0,0364
	8 1/4	2,73	0,95	0,023
	11 1/2	3,50	1,06	0,018
	16	3,85	0,96	0,0178
	19	4,2	0,96	0,0166

Acidité en HCl : 2,992 ‰

<i>Ovalbumine</i> . . .	4	2,45	1,22
	9	3,64	1,21
	12	3,92	1,13
	20	4,62	

	TH	N _o , _o	$k = \frac{x}{\sqrt{t}}$	$k = \frac{1}{t} \text{Log}_n \frac{a}{(a-x)}$
<i>Edestine</i>	4	3,64	1,82	
	9	5,46	1,82	
	12	6,02	1,73	
	16	6,30	1,57	
	20 1/2	6,37	1,40	
	24	6,87	1,40	
	30	7,28	1,32	
	32	7,28		
<i>Clupéovine</i>	46	7,28		
	4 3/4	2,450	1,15	
	7 3/4	3,5	1,25	
	11 3/4	4	1,17	
<i>Fibroïne</i>	15	4,34	1,12	
	4 1/2	3,71	1,75	0,058
	7	5,6	2,12	0,061
	9	6,44	2,13	0,057
	10	7,07	2,24	0,058
	15	8,68	2,24	0,052
	21	10,50	2,29	0,050
	30	12,6	2,30	0,051
	65	15,4		0,201

Acidité en HCl : 3,74 %

<i>Gélatine</i>	3 1/4	5,10	2,83	0,10822
	6 1/4	6,37	2,74	0,0176
	9 1/4	6,79	2,23	0,01280
	13 1/4	7,62	2,06	0,0101
	16 1/2	8	2	0,00904

	TH	N %	K $\frac{\lambda}{\sqrt{t}}$	$k = \frac{1}{t} \log_n \frac{a}{(a-x)}$
	30	8,6	1,55	
	38 1/2	9,24		
<i>Ovalbumine</i> ..	8 1/2	3,78	1,29	0,00883
	13	4,34	1,20	0,006813
	18	4,76	1,12	0,004984
	21	5,04	1,10	
<i>Edestine</i>	2	3,15	2,2	
	5	4,76	2,13	
	8	5,6	2,34	
	11	6,2	1,87	
	15	6,8	1,86	
<i>Edestine</i>	4	4,34	2,17	
	9	6,3	3,1	
	13 1/4	7,35	2,02	
	17 1/2	8,19	1,95	
	21 1/2	8,84	1,92	
<i>Fibroïne</i>	3	4,55	2,65	
	5	6,65	2,98	
	12 3/4	11	3,1	
	20	13,2	2,95	
	24	14	2,98	
	41	15,82	2,47	

Acidité en HCl : 5,45 %

<i>Gélatine</i>	1,1	2,59	2 59
	3 1/2	5,32	2 84
	4 1/2	5,6	2 64

	TH	N °, °	$k = \frac{x}{\sqrt{t}}$	$K = \frac{1}{t} \text{Log}_n \frac{a}{(a \vee)}$
	7	7,42	2,81	
	24 1/4	10,15		
<i>Gélatine</i>	3 1/4	6,3	3,36	
	6 1/4	7,84	3,13	
	9 1/4	8,4	2,76	
	16 1/2	8,76	2,19	
	21 1/2	9,58		
	30 1/4	9,8		
	38 1/2	9,8		
<i>Ovalbumine</i> ..	1/2	0,98	1,4	
	2	2,38	1,68	
	5	4,2	1,87	
	14	6,44	1,72	
<i>Caséine</i>	1/4	1,54	3,08	
	2	3,08	2,17	
	5	4,2	1,86	
	10	5,32	1,68	
	18	6,16	1,68	
<i>Edestine</i>	3/4	2,24	2,60	
	1 1/2	3,22	2,63	
	5	5,6	2,51	
	10	7,28	2,30	
<i>Clupéovine</i>	4 1/2	3,78	1,78	
	8 1/2	5,32	1,82	
	13	6,16	1,71	
<i>Clupéine</i>	1/4	3,15	6,3	
	1/2	3,32	4,7	

	η_{sp}	N %	$k = \frac{\eta}{c}$	$K = \frac{1}{t} \log_{10} \frac{a}{(a-x)}$
	1	3,5	3,5	
	2 1/2	4,37	2,7	
	5	4,65	2	
	10	5,25		
<i>Fibroïne</i>	1 1/2	3,22	2,64	0,15
	3	4,76	2,74	0,117
	5,5	6,58	2,77	0,096
	10 1/2	9,1	2,8	0,0840
	21	11,06	2,41	
	31 1/2	12,46	2,24	

Acidité en HCl : 7,48 %

<i>Ovalbumine</i> ..	2 1/2	3,29	2,08
	8	5,04	1,78
	14	5,18	1,39
	18 1/2	5,6	1,32
	22	5,94	1,27
<i>Caséine</i>	3	4,97	2,87
	6	6,78	2,77
	10 1/4	8,26	2,58
	13 1/2	8,68	2,37
	21 1/2	9,3	2
	31 1/2	9,8	1,75
	40 1/2	10	
<i>Edestine</i>	2	4,550	3,22
	4 1/2	6,93	3,26
	10	8,02	2,53

	TH	N ‰	$K = \frac{v}{v-l}$
	13	8,96	2,48
	18	9,45	2,22
	23	10,36	2,1
	28	10,36	
	32	10,36	
<i>Clupéovine</i>	4	4,76	2,38
	7	6,02	2,28
	12	6,72	1,9
	16	7,56	1,89
	24	8,04	1,64
	32	8,8	1,5
	38	8,96	1,45
<i>Fibroïne</i>	4 1/2	11,06	5,2
	9 1/2	14,14	4,5
	18 1/2	15,54	3,66
	22 3/4	15,54	

Acidité en HCl : 9,35 %

<i>Clupéovine</i>	4 3/4	6,44	2,96
	7 3/4	7,70	2,77
	11 3/4	8,18	2,37
	15 3/4	8,04	2,06

Acidité en HCl : 11,22 %

<i>Gélatine</i>	1/4	3,08	6,15
	1/2	5,32	7,52
	2 1/2	8,68	5,49
	17	10,36	2,51

	TH	N ‰	$K = \frac{x}{V_t}$
<i>Ovalbumine</i> ..	1/2	2,3	3,3
	1 1/2	3,78	3,09
	5	6,02	2,69
	10	7	2,25
<i>Caséine</i>	1/4	2,24	4,5
	3/4	3,36	3,79
	1 1/2	4,62	3,78
	6	7	2,6
<i>Edestine</i>	3/4	3,78	4,39
	1 1/2	4,9	4,01
	5	7,7	3,45
	10	9,11	2,88

<i>Fibroïne</i>			
(1 ^{re} Observ.) ..	3	12,32	
	11 1/2	14	
	20 1/2	14,7	

<i>Fibroïne</i>			
(2 ^e Observ.) ..	3/4	5,6	6,51
	2	9,24	6,55
	5	12,6	5,65
	10	13,44	4,56

Acidité en HCl : 18,7 %

<i>Caséine</i>	1/4	3,22	6,45
	3/4	4,76	5,53
	1 1/2	6,58	5,4
	5	7,84	2,78

Acidité en HCl : 29,92 %

	TH	N ‰	$k = \frac{x}{\sqrt{t}}$
	3/4	5,32	6,19
	1 1/2	7	5,72
	4 1/2	8,12	3,83
<i>Caséine</i>	1/4	3,92	7,84
	3/4	6,3	7,32
	1 1/2	7,14	5,85
<i>Edestine</i>	3/4	6,3	7,32
	1 1/2	8,26	6,76
	5	9,1	4,08

Acidité en HCl : 37,4 %

<i>Gélatine</i>	Départ	0,56	
	3	11,9	6,87
	6	11,76	4,8
	9	11,9	3,97
	13 1/2	12,04	

Edestine

(1 ^{re} Observ.) ..	4	10,22	5,11
	9	10,08	3,36
	13 1/4	10	2,73
	17 1/2	10,5	2,5
	21 1/2	10,7	

Edestine

(2 ^e Observ.) ..	4	10,5	5,25
	8 1/4	10,25	3,56
	12 1/4	11,1	3,2

	TH	N %	$K = \frac{v}{v_t}$
	38	11,90	1,93
	47	11,83	
<i>Fibroïne</i>	3 1/4	13,58	5,7
	5 1/4	13,64	5,95
	7 1/4	14,77	5,49
	25	15,12	3,02
	46	16,4	

A. — Examinons d'abord les graphiques qui représentent le phénomène d'hydrolyse des protéines. Plusieurs points méritent d'attirer notre attention :

1° Les courbes sont d'une parfaite régularité. Nous avons, en les traçant, réuni simplement les points donnés par l'expérience. Parfois, un léger écart correspondant aux erreurs d'expérience nous obligeait à passer entre deux points, mais ces divergences sont insignifiantes et relèvent d'erreurs de dosage inévitables.

Nous aurons l'occasion de critiquer le dosage Sørensen pratiqué selon la technique que nous avons adoptée, technique comportant une double neutralisation à la phénol-phtaléine, l'une avant, l'autre, après l'addition de la solution formolée.

Nous montrerons que ce dosage, s'il rend parfaitement compte de l'azote des amino-acides laisse échapper une partie de celui des polypeptides. Nos courbes traduisent surtout la cinétique de la libération des acides aminés.

2° Cette libération se réalise suivant un type pres-

que toujours semblable à lui-même, se reproduisant de manière identique, avec des variations quantitatives conditionnées par le pourcentage d'agent d'hydrolyse utilisé.

3° Cependant, ces courbes doivent être réparties en deux catégories bien distinctes:

La plupart, après une certaine évolution s'inclinent et deviennent parallèles à la ligne des abscisses. Ce plateau traduit l'établissement d'un équilibre. Loin d'aboutir à une transformation totale de la protéine, l'hydrolyse s'atténue, puis s'arrête après un certain temps d'évolution.

Si l'on compare les quantités d'azote dégagées pour les différents équilibres d'une même protéine, on voit que ces quantités augmentent avec l'acidité du milieu d'hydrolyse. Cet accroissement est extrêmement régulier, comme le mettent en évidence les courbes de la fig. 11. Ces faits sont nets pour la clupéovine, l'ovalbumine, la caséine, la gélatine et même l'édestine.

Au contraire, la fibroïne est entièrement différente, même en présence de faibles doses d'agents hydrolysants, elle tend vers la libération totale de son azote aminé, sous la forme formol-titrable. C'est ainsi que pour une acidité de 0,374 %, la plus basse que nous ayons utilisée, alors que les courbes des autres protéines s'inclinent rapidement pour aboutir à des plateaux, la courbe de la fibroïne de la soie monte en une ligne qui ne s'infléchit pas et réalise une droite. Et cette disposition se retrouve pour toutes les acidités. La fibroïne tend avec le plus faible catalyseur à libérer la quantité totale de son azote aminé.

Elle s'oppose en cela profondément aux autres albumines.

Ce fait comporte un intérêt pratique. On sait depuis longtemps déjà que les produits tinctoriaux qui contiennent des chlorures sont capables de réaliser une hydrolyse de la soie qui peut être poussée très loin. Ils causent parfois à l'industrie de la soie naturelle de graves préjudices. On a montré, à la suite d'un certain nombre d'accidents de cet ordre, que les chlorures sont partiellement hydrolysés en présence de certaines albumines (soie-gélatine) et produisent de faibles doses d'acide chlorhydrique. Cet acide, si minime que puisse être la quantité qui en sera produite, réalisera les conditions de nos expériences et agira comme un catalyseur capable de libérer la totalité de l'azote aminé de la fibroïne de la soie.

4° Enfin, nous voyons que très souvent les albumines que nous avons individualisées sous le nom d'albumines de nutrition et qui sont l'ovalbumine, la clupéovine et la caséine, possèdent des courbes qui se confondent.

Elles forment un ensemble qui s'hydrolyse difficilement si on les oppose aux groupes formés par la gélatine, l'édestine ou la fibroïne.

Ces albumines présentent des courbes très rapidement ascendantes traduisant une hydrolyse plus facile par les acides.

Remarquons que le premier groupe renferme des albumines pauvres en glyco-colle, alors que le deuxième groupe, au contraire, renferme des albumines riches en cet amino-acide. Il semble donc que les

cycles à base de glyocolle confèrent aux albumines qui les possèdent une certaine susceptibilité pour les acides.

B. — *L'étude mathématique* des résultats obtenus est moins fructueuse:

1° Nous avons, conformément aux idées que nous avons précédemment développées, essayé d'appliquer un certain nombre de constantes théoriques. Aucune ne se vérifie pour les fortes acidités, qui échappent à toute constante physique.

Cependant, les faibles acidités semblent plus facilement s'adapter à une constante définie.

La fibroïne vérifie parfois, dans des limites de temps assez étroites d'ailleurs, la constante de premier ordre. On en trouvera des exemples dans notre étude. L'évolution de l'hydrolyse de la fibroïne, sous l'action d'une acidité de 2,992 calculée en HCL, est particulièrement typique.

2° Les autres protéines ne répondent à aucune des constantes que nous avons calculées (la constante de premier ordre avec réversibilité ne s'applique pas). Elles semblent cependant, dans les hydrolyses à faible acidité, s'adapter assez bien à la formule. $K = \frac{x}{\sqrt{t}}$

Un travail relativement récent dû à Jaitschnikow ⁴⁰ nous montre que cette constante empirique peut être appliquée à certaines phases de l'hydrolyse acide ou basique de quelques protides. Notre travail, qui comporte des conditions expérimentales différen-

40. J. S. JAITSCHNIKOW, Die hydrolyse der protein durch Säuren und ulkalien *Biochem. Zeitsch* 190, p. 114-121, 1927.

tes de celles de l'auteur précité, confirme en partie ses conclusions.

3° Il arrive assez rarement d'ailleurs, un plateau étant établi, qu'après plusieurs heures d'une hydrolyse qui n'augmente plus, une légère régression soit notée.

Des faits semblables se retrouvent dans les protocoles d'expériences des auteurs qui se sont occupés de tels sujets. C'est ainsi que nous notons dans les expériences de Jaitschnikow les chiffres suivants obtenus pour l'hydrolyse de l'édestine par l'acide chlorhydrique N à 37°:

Heures:	1	2	4	6	8
N :	0,04	0,06	0,12	0,2	0,18

Nous avons de même trouvé une semblable chute dans quelques-unes de nos hydrolyses. Nous en citerons un exemple: hydrolyse de la gélatine en présence d'une acidité en HCl: 0,374 %:

Heures:	4	8	12	19	27
N :	0,84	1,04	1,26	1,4	1,33

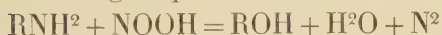
Nous signalons ce phénomène, car nous pensons qu'il ne s'agit pas d'une erreur d'expérience. Nous avons reproduit dans ce cas plusieurs fois nos dosages et cherché à éviter autant qu'il se peut toute cause d'erreur. Nous ne connaissons pas actuellement d'explications valables de ce phénomène.

Peut-être les équilibres obtenus sont-ils seulement des oscillations autour d'une moyenne que modifie les très légères variations de facteurs inconnus.

CHAPITRE V

ETUDE DE LA MARCHE DE L'HYDROLYSE AU MOYEN DE LA MÉTHODE DE VAN SLYKE

En 1911, D. D. Van Slyke ⁴¹ proposa une nouvelle méthode de dosage des groupements aminés. Elle s'appuie sur la réaction bien connue de l'acide nitreux sur les groupements aminés selon la formule:



En pratique, l'acide nitreux utilisé est obtenu par la réaction de l'acide acétique sur du nitrite de soude pur. On produit un certain nombre de gaz, dont NOOH et NO. Par action sur les substances aminées il se dégage une quantité d'azote double de la quantité théorique.

L'ensemble de ces divers gaz est envoyé dans des ampoules contenant une solution de permanganate de potasse et de potasse. Ces liquides n'épargnent que l'azote, lequel est dosé dans un azotomètre. Van Slyke

41. D. D. VAN SLYKE, A method for quantitative determination of aliphatic amino-groups. *The Journ. of biol. chemistry*, 9 (1911), p. 185-208.

a donné la description d'un appareil qui depuis a été modifié. On le trouve actuellement dans le commerce. Nous l'avons utilisé pour nos dosages. Nous avons pris quelques précautions particulières. L'azotomètre livré dans le commerce est généralement gradué au $1/10^{\circ}$ de centimètre cube. Afin d'obtenir plus de précision, nous lui avons substitué un azotomètre divisé en $1/20^{\circ}$ de centimètre cube. L'appareil devant être par deux fois agité, afin de permettre une agitation plus facile, les constructeurs ont adapté un système de mouvement rotatoire qui peut être entraîné par un moteur. En réalité, la brutalité du moteur électrique est trop grande et nous avons préféré entraîner la roue à la main, la rapidité obtenue avec une certaine habitude étant très suffisante. Nous avons suivi par ailleurs la méthode classique de Van Slyke ⁴².

Les résultats obtenus sont les suivants:

La première colonne représente le temps d'hydrolyse.

La deuxième colonne l'azote trouvé aux différents temps.

42. D. D. VAN SLYKE, The quantitative determination of aliphatic amino-group. *Journ. of biol. chem.* 12, 1912, p. 275-285.

D. D. VAN SLYKE, The gazometric determination of aliphatic amino nitrogen in minutes quantities. *J. of biol. chem.* 16, 1913, 14, p. 121-125.

DOSAGES PAR LA MÉTHODE DE VAN SYLKE

Acidité en HCl: 1,496 %

	TH	N %	$K = \frac{N}{\sqrt{L}}$
<i>Gélatine</i>	1 1/2	2,63	2,15
	3	3,8	2,19
	5	4,62	2,07
	7	5,36	2,03
	10	6,31	2
	15	6,27	
	20	6,58	1,45
	25	6,88	

Acidité en HCl: 5,45 %

<i>Gélatine</i>	1,1	5,84	5,84
	3 1/2	8,8	4,7
	4 1/2	9,19	4,33
	7	9,98	3,78
	24 1/2	12,23	
<i>Ovalbumine</i> ...	1/2	2,40	3,43
	2	4,81	3,41
	5	7,61	3,41
	14	9,38	2,5
<i>Caséine</i>	1/4	2,32	4,65
	2	5,29	3,74
	5	6,85	3,07
	10	8,05	2,54
	18	7,86	

	TH	N %	$k = \frac{x}{\sqrt{t}}$
<i>Edestine</i>	3/4	4,41	5,87
	1 1/2	8,1	6,31
	5	9,7	4,3
<i>Clupéine</i>	1/4	3,43	
	1	3,91	
	2 1/2	5,15	
	5	5,77	
	10	6,74	
<i>Fibroïne</i>	1 1/2	7,62	6,16
	3	9,25	5,34
	5 1/2	11,44	4,88
	10 1/2	14,3	4,41
	21	15,56	3,49
	31	16,15	

Acidité en HCl: 11,22 %

<i>Gélatine</i>	1/4	6,95
	1/2	8,648
	2 1/2	10,29
	17	10,81
<i>Caséine</i>	1/4	3,37
	3/4	4,92
	1 1/2	6,67
	6	9,03
<i>Ovalbumine</i> ..	1/2	3,76
	1 1/2	6,74

	TH	N %.
	5	8,98
	10	9,18
<i>Edestine</i>	3/4	6,2
	1 1/2	8,74
	5	10,18
	10	9,98
<i>Fibroïne</i>	3/4	10,887
	2	13,28
	5	16,54
	10	16,87

Acidité en HCl: 29,92 %

<i>Caséine</i>	1/4	6,53
	1 1/2	9,21
<i>Ovalbumine</i> ...	3/4	8,45
	1 1/2	8,68
	4 1/2	9,92
<i>Edestine</i>	3/4	8,027
	1 1/2	10,18
	5	11,096

Nous aurons divers reproches à formuler contre la méthode de Van Slyke. Elle donne généralement pour les polypeptides des chiffres trop élevés.

Les résultats obtenus sont différents de ceux fournis par la formol-titration. Nous verrons que les hydrolyses suivies par cette technique (avec deux neutralisations à la phénol-phtaléine avant et après

addition de formol) permettent de déterminer surtout le dégagement des amino-acides. La méthode de Van Slyke au contraire donne une valeur anormalement grande à l'azote aminé des peptides.

Cependant, l'allure des courbes reste la même, quelle que soit la méthode utilisée pour suivre l'hydrolyse.

Nous retrouvons la fibroïne individualisée par sa courbe, qui monte d'emblée vers un point d'ordonnée maximum.

Les autres protéines se divisent en deux groupes :

L'ovalbumine, la clupéovine, la caséine d'une part s'hydrolysant lentement.

La gélatine et l'édestine d'autre part, subissant une hydrolyse plus rapide.

CHAPITRE VI

ÉTUDE DES VARIATIONS DE LA DIFFÉRENCE N AMINÉ VAN SLYKE MOINS N AMINÉ SÖRENSEN

Nous avons pratiqué des dosages Van Slyke et Sörensen sur les mêmes prélèvements des mêmes liquides d'hydrolyses de protéines.

Le liquide prélevé était divisé en deux parts ; sur la première, un dosage Van Slyke était immédiatement réalisé, sur la seconde part, une formol-titration était aussi exécutée. Pour cela, nous procédions alors avec une technique un peu différente de celle de Sörensen. Le liquide était neutralisé à la phénolphtaléine jusqu'au rouge net, puis une quantité de formol excédant de beaucoup la quantité utile était alors ajoutée. Une titration était faite au moyen de la soude N/20 jusqu'à la coloration obtenue précédemment, toujours avec la phénol-phtaléine comme indicateur.

Les différences entre les deux dosages pouvaient être alors calculées :

DIFFÉRENCE ENTRE N AMINÉ VAN SLYKE
ET N AMINÉ SORENSSEN

Acidité en HCl : 1,496 %

Gélatine :

Temps	N %	Diff.	Temps	N %	Diff.
1 1/2	V.S... 2,63	0,81	3	V.S... 3,8	1,63
	S..... 1,82			S..... 2,17	
5	V.S... 4,62	1,75	7	V.S... 5,36	2,28
	S..... 2,87			S..... 3,08	
10	V.S... 6,31	3,02	15	V.S... 6,31	2,60
	S..... 3,29			S..... 3,71	
20	V.S... 6,58	1,96	25	V.S... 6,88	2,43
	S..... 4,62			S..... 4,41	

Acidité en HCl : 5,45 %

Gélatine :

1,10	V.S... 5,844	3,25	3,5	V.S... 8,80	3,48
	S..... 2,59			S..... 5,32	
4,5	V.S... 9,19	3,59	7	V.S... 9,98	2,56
	S..... 5,6			S..... 7,42	
24,5	V.S... 12,23	2,08		V.S... 12,23	
	S..... 10,15			S..... 10,15	

Ovalbumine :

1/2	V.S... 2,406	1,42	2	V.S... 4,81	2,43
	S..... 0,98			S..... 2,38	
5	V.S... 7,61	3,41	14	V.S... 9,38	2,94
	S..... 4,2			S..... 6,44	

Caséine :

Temps	N %	Diff.	Temps	N %	Diff.
1/4	V.S... 2,32	0,78	2	V.S... 5,29	2,21
	S..... 1,54			S..... 3,08	
5	V.S... 6,858	2,65	10	V.S... 8,056	2,73
	S..... 4,2			S..... 5,32	
18	V.S... 7,86	1,7		V.S... 8,056	
	S..... 6,16			S..... 5,32	

Edestine :

3/4	V.S... 4,41	2,17	1 1/2	V.S... 8,1	4,88
	S..... 2,24			S..... 3,22	
5	V.S... 9,7	4,1	10	V.S... 9,2	1,92
	S..... 5,6			S..... 7,28	

Clupéine :

1/4	V.S... 3,43	0,26	1	V.S... 3,91	0,41
	S..... 3,15			S..... 3,5	
2 1/2	V.S... 5,15	0,78	5	V.S... 5,77	1,12
	S..... 4,375			S..... 4,65	
10	V.S... 6,74	1,49		V.S... 6,74	
	S..... 5,25			S..... 5,25	

Clupéovine :

1	V.S... 2,75	1,35	2	V.S... 4,45	1,79
	S..... 1,4			S..... 2,66	
4 1/2	V.S... 6,235	2,175	10	V.S... 7,81	2,49
	S..... 4,06			S..... 5,32	
15	V.S... 8,98	2,82	22 1/2	V.S... 9,16	2,86
	S..... 6,16			S..... 6,3	

Fibroïne :

Temps	N %	Diff.	Temps	N %	Diff.
1 1/2	V.S... 7,62	4,4	3	V.S... 9,25	4,49
	S..... 3,22			S..... 4,76	
5 1/2	V.S... 11,44	4,86	10 1/2	V.S... 14,3	5,2
	S..... 6,58			S..... 9,1	
21	V.S... 15,568	3,94	31 1/2	V.S... 16,15	3,69
	S..... 11,06			S..... 12,46	

Acidité en HCl : 11,22 %

Gélatine :

1/4	V.S... 6,95	3,87	1/2	V.S... 8,648	3,32
	S..... 3,08			S..... 5,32	
2 1/2	V.S... 10,29	1,61	17	V.S... 10,81	0,45
	S..... 8,68			S..... 10,36	

Ovalbumine :

1/2	V.S... 3,76	1,46	1 1/2	V.S... 6,74	2,96
	S..... 2,3			S..... 3,78	
5	V.S... 8,98	2,96	10	V.S... 9,18	2,18
	S..... 6,02			S..... 7	

Caséine :

1/4	V.S... 3,37	1,13	3/4	V.S... 4,92	1,56
	S..... 2,24			S..... 3,36	
1 1/2	V.S... 6,67	2,05	6	V.S... 9,03	2,03
	S..... 4,62			S..... 7	

Edestine :

3/4	V.S... 6,2	2,42	1 1/2	V.S... 8,74	3,84
	S..... 3,78			S..... 4,9	
5	V.S... 10,18	2,48	10	V.S... 9,98	0,88
	S..... 7,7			S..... 9,11	

Clupéovine :

Temps	N %	Diff.	Temps	N %	Diff.
1/2	V.S... 3,055	1,51	1	V.S... 5,16	2,08
	S..... 1,54			S..... 3,08	
2	V.S... 6,83	2,35	6	V.S... 9,3	2,4
	S..... 4,48			S..... 6,9	
19	V.S... 10,38	2,26	28	V.S... 10,38	1,84
	S..... 8,12			S..... 8,54	

Fibroïne :

3/4	V.S... 10,887	5,287	2	V.S... 13,28	4,04
	S..... 5,6			S..... 9,24	
5	V.S... 16,54	3,94	10	V.S... 16,87	3,43
	S..... 12,6			S..... 13,44	

Acidité en HCl : 18,25 %

Caséine :

1/4	V.S... 5,45	2,23	3/4	V.S... 7,46	2,7
	S..... 3,22			S..... 4,76	
1 1/2	V.S... 9,4	2,82	5	V.S... 9,54	1,7
	S..... 6,58			S..... 7,84	
9	V.S... 9,54	1,7		V.S... 9,54	
	S..... 7,84			S..... 7,84	

Acidité en HCl : 29,92 %

Ovalbumine :

3/4	V.S... 8,45	3,13	1 1/2	V.S... 8,68	1,68
	S..... 5,32			S..... 7	
4 1/2	V.S... 9,92	1,8		V.S... 9,92	
	S..... 8,12			S..... 8,12	

Caséine :

Temps	N %	Diff.	Temps	N %	Diff.
1/4	V.S... 6,53 S..... 3,92	2,61	3/4	V.S... 9,21 S..... 6,3	2,91
1 1/2	V.S... 9,21 S..... 7,14	2,15			

Edestine :

3/4	V.S... 8,027 S..... 6,3	1,72	1 1/2	V.S... 10,18 S..... 8,26	1,92
5	V.S... 11,096 S..... 9,1	1,99			

Les courbes qui représentent ces différences nous permettent de mieux suivre leurs variations.

1° Acidité en HCl à 1,496 %.

L'absence de solubilité des diverses albumines à cette acidité pendant les premières heures de l'hydrolyse gêne les observations. C'est pourquoi nous ne l'avons étudié que sur la gélatine. La différence (VS - S) croît jusqu'à la 15^e heure, puis décroît ensuite.

2° Acidité en HCl à 5,45 %.

Si nous exceptons la clupéine que nous étudierons à part, à cause de sa constitution bien particulière, toutes nos courbes marquent deux temps bien distincts. Pendant les premières heures de l'hydrolyse (plus ou moins rapidement, selon la protéine considérée), les courbes suivent une direction ascendante. La différence V.S. - S. va croissant, puis dans un second temps, les courbes se rapprochent de la ligne des abscisses,

leur direction est nettement descendante, la différence V.S. - S. diminue.

Ces mêmes courbes peuvent se diviser en deux groupes :

Les unes atteignent rapidement le point d'ordonnée maxima, elles marquent ainsi des écarts relativement élevés. Ce sont les courbes de la fibroïne, de la gélatine et de l'édestine.

Les autres présentent un accroissement plus lent, ce sont la caséine et l'ovalbumine.

3° Hydrolyse à 11,22 %.

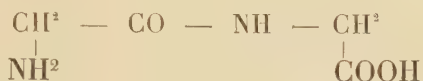
Les courbes à cette acidité reproduisent les types précédents. On distingue un groupe rapide, dont la différence VS - S, atteint son maxima en 1/2 heure, ce groupe étant constitué par la fibroïne et la gélatine et un groupe lent, dont le maximum n'est atteint qu'en une heure et demi environ, groupe formé par la clupéovine, la caséine et l'ovalbumine.

Ainsi, les albumines présentent au cours de leur hydrolyse un écart entre les deux dosages de l'azote aminé Van Slyke et de l'azote aminé Sørensen. Cet écart croît d'abord puis décroît. Tout se passe comme s'il était lié à la présence d'un produit intermédiaire qui naît au cours de l'hydrolyse et se détruit ensuite. Nous allons essayer de discerner par l'étude des peptides de synthèse quel est ce produit. Nous interpréterons ensuite à la lumière de cette hypothèse les courbes que nous avons obtenues.

CHAPITRE VII

ETUDE DE LA GLYCYLGLYCINE ET DE LA CYCLOGLYCYLGLYCINE

La glycyl-glycine, de formule



est un dipeptide qui comporte outre une fonction amide $\text{CO} - \text{NH}$, dont l'azote est dissimulé aux deux dosages Sørensen et Van Slyke, un groupement acide et un groupement aminé. L'azote de ce dernier groupement est mesurable au dosage Sørensen et au dosage Van Slyke. La quantité d'azote trouvée par l'une et l'autre méthode, doit être de 10,60 %.

Cependant, si nous prenons une quantité connue de ce corps et que nous dosions l'azote par l'une et l'autre de ces méthodes, nous trouvons deux chiffres nettement différents.

La formol-titration pratiquée, comme nous l'avons déjà indiquée, c'est-à-dire en neutralisant deux fois à la phénol-phtaléine : (une première fois avant et une seconde fois après addition de formol), donne un chiffre beaucoup trop faible (environ $N = 6,44\%$) alors que le dosage Van Slyke pratiqué selon la technique

classique donne un chiffre beaucoup trop fort (N = 13,08 %).

Nous avons pensé que là pourrait sans doute se trouver l'explication des différences (V.S. — S.) notées au cours de l'étude de nos protéines et nous avons poussé aussi loin que possible l'étude de ces écarts de titration.

A. — *Mode d'obtention et description
des produits utilisés*

Nous avons préparé la glycyl-glycine que nous avons utilisée à partir de la cyclo-glycyl-glycine. Nous avons obtenu celle-ci tantôt par le procédé de Fischer, tantôt par le procédé de Maillard.

1° Préparation de la cycloglycylglycine par la technique de Fischer :

a) Préparation du chlorhydrate d'éthyl glycolle ⁴³
100 gr. de glycolle finement pulvérisé sont mis en suspension dans 1/2 litre d'alcool absolu. On fait alors passer un courant d'acide chlorhydrique sec jusqu'à dissolution totale. La dissolution peut être aidée en élevant la température au moyen d'un bain marie (en pratique, la température s'élève spontanément par suite de la dissolution de l'acide dans l'alcool et un bain marie est inutile).

Dès que la solution est complète, la réaction peut être considérée comme terminée. Le chlorhydrate

43. CURTIUS, *Journ. fur. prakt. chem.* T. 24, 1881, p. 239-240.
— E. FISCHER, *Ber. Chem. Ges.* 1905, T. 39, p. 2930.

d'éthyl glycolle cristallise au fur et à mesure que refroidit sa solution alcoolique. Il est essoré, lavé à l'alcool absolu jusqu'à ce que les dernières traces d'acide chlorhydrique aient disparu.

b) Préparation de la cycloglycylglycine : 56 gr. d'éthylglycolle sont placés dans un b cher à fortes parois avec 28 cm³ d'eau. L'ensemble est bien refroidi au moyen d'un bon mélange réfrigérant (— 10 ) et tout en agitant énergiquement, on ajoute goutte à goutte, 32 cm³ de soude, 11,5 fois normale, ceci très lentement (en 2 à 4 heures). La température ne doit jamais s'élever au-dessus de — 3 .

Le chlorhydrate tout entier passe peu à peu en solution, tandis qu'il se précipite un peu de chlorure de sodium. La quantité de soude doit être légèrement inférieure à celle qui serait nécessaire pour fixer la totalité de l'acide chlorhydrique donné par le chlorhydrate.

La précipitation de l'anhydride commence après quelques heures et l'opération est généralement terminée en 24 heures. On refroidit alors très fortement, on essore. Le chlorure est éliminé par lavage avec le moins possible d'eau glacée.

2  Préparation de la cycloglycylglycine par la méthode de Maillard ⁴⁴.

Lorsqu'on veut obtenir la cyclo-glycyl-glycine (2.5. diacipip razine) pure le plus simplement possible, et sans avoir à se préoccuper de l'élimination d'une trace de triglycyl-glycine éventuelle (le procédé au glyci-

44. L. C. MAILLARD, Action de la glycérine et des sucres sur les acides α aminés. *Thèse Sciences*, Paris, 1913.

nate d'éthyle introduit lui aussi dans le produit un peu de triglycyl-glycinate d'éthyle), on opère ainsi. Le glyocolle placé dans un vase cylindrique est dissous dans le minimum d'eau bouillante, puis additionné d'un excès de bonne glycérine pure du commerce, et le vase est placé dans une étuve à air. On chauffe l'étuve et on maintient ensuite sa température entre 170° et 175°, soit à l'aide d'un régulateur automatique, soit tout simplement en manœuvrant de temps en temps le robinet de gaz, ce qui ne demande qu'une surveillance insignifiante. A partir du moment où le mélange a pris une teinte brun-noir accentuée, on le maintient encore à 170°-175° pendant une ou plusieurs heures, temps qui varie naturellement avec la forme du vase, le volume du liquide et sa surface. Si l'on veut s'assurer que la triglycyl-glycine formée en petite quantité dans les premières phases de la condensation a maintenant disparu (par cyclisation, en anhydride polyglycyl-cyclique) et ne pourra venir souiller le produit, il suffit d'essayer sur quelques gouttes du mélange sirupeux la réaction du biuret.

Quand toute réaction biurétique a disparu, on laisse refroidir le mélange, qui se prend généralement bientôt en un magma plus ou moins épais, rempli de petits cristaux. On lave ces cristaux avec un peu d'alcool absolu (ou simplement avec de l'alcool à 96°) qu'on décante et renouvelle plusieurs fois. L'alcool dissout la glycérine et laisse la majeure partie de la cyclo-glycyl-glycine ⁴⁵. On dissout alors le résidu cris-

45. Il arrive souvent que les lavages alcooliques, réunis, laissent cristalliser, surtout lorsqu'on les laisse séjourner au froid, encore

tallin dans l'eau bouillante ⁴⁶, laisse digérer avec un peu de noir animal qui fixe la majeure partie de la matière brune, filtre, concentre au bain-marie jusqu'à cristallisation commençante, et refroidit rapidement en agitant. Les cristaux sont d'emblée presque complètement purs, à part une légère teinte jaunâtre, provenant d'une trace impondérable de matière colorante, que les recristallisations dans l'eau éliminent difficilement. Pour avoir tout à fait blancs les cristaux de la cyclo-glycyl-glycine (2.5. diacipipérazine), il convient de les redissoudre dans un peu d'eau bouillante, ajouter 3-4 volumes d'alcool fort, et refroidir en agitant.

3° Préparation de la glycylglycine. Une technique très simple que nous avons utilisée a été donnée par Maillard :

5 grammes de cyclo-glycyl-glycine pure pulvérisée sont introduits dans un flacon avec 50 cc. de soude normale, et agités jusqu'à dissolution complète, ce qui demande environ 20 minutes ; puis, après 20 autres minutes d'attente, on ajoute 50 cc. d'acide acétique normal, en constatant pour contrôle le virage au rose d'un fragment de papier de tournesol immergé dans la solution. Abandonné dans le vide sur H^2SO^4

une certaine fraction de la cyclo-glycyl-glycine, qui était restée dissoute dans la glycérine. Ces cristaux, très purs, peuvent être utilement recueillis et lavés rapidement à l'alcool.

46. Il ne faut pas chercher à obtenir ici une solution limpide, à cause des parcelles insolubles d'anhydride polyglycylique (provenant de cyclisation de la triglycyl-glycine) qui restent en suspension. On s'aperçoit aisément que la partie fondamentale, cristalline, est dissoute, et l'on peut, ou bien séparer l'anhydride polyglycylique par centrifugation, ou, si l'on ne désire pas le recueillir, ajouter immédiatement le noir animal.

pendant 2 jours, le liquide donne un sirop épais, puis une masse vitreuse, mais aucune cristallisation. On reprend alors par un peu d'eau bouillante, jusqu'à un volume de 20cc. environ, on ajoute 3 volumes d'alcool à 96° qui produit un abondant précipité immédiat, et on essore aussitôt à la trompe, sans laisser refroidir. Les cristaux essorés sont redissous dans l'eau bouillante, jusqu'à un volume de 15 cc. ; on précipite une deuxième fois par 3 volumes d'alcool, et on essore aussitôt.

4° Les propriétés de la glycylglycine obtenue par l'une et l'autre technique sont les mêmes que celles décrites par E. Fischer et E. Fourneau ⁴⁷ puis retrouvées par Maillard. Il s'agit d'un corps cristallisant en petits feuillets d'éclat nacré qui brunissent et se décomposent sans fondre vers 215°-220°. Très soluble dans l'eau chaude et, disent E. Fischer et E. Fourneau, moins solubles dans l'eau froide (tous nos échantillons étaient assez facilement solubles dans l'eau froide), elle est très difficilement soluble dans l'alcool et l'éther. Elle dissout l'oxyde cuivrique en suspension aqueuse et donne un liquide bleu foncé.

Nous avons dosé l'azote au moyen de la méthode de Dumas et nous avons trouvé 21,13. Théorie 21,31.

B. — *Etude de la formol-titration de la glycyl-glycine*

Si l'on examine la réaction d'une solution de glycylglycine, on la trouve légèrement acide au tournesol,

47. E. FISCHER et E. FOURNEAU, Ueber einige Derivate des glykocolls, *Ber. d. d. chem. Ges.* 34, 1901, p. 2868.

nettement acide à la phénol-phtaléine. Ce caractère acide ne varie pas après plusieurs redissolutions du corps dans l'eau bouillante et reprécipitations par l'alcool. Elle semble donc inhérente à une constitution spéciale de la molécule.

Nous avons recherché le P_H d'une solution N/10 de glycyl-glycine à la température du laboratoire et au moyen d'un électromètre à électrode à la quinhydrone. Nous l'avons trouvé égal à 5,4.

Ce fait avait été entrevu par Henriquès et Sørensen⁴⁸ dont voici le protocole d'expérience :

20 cc. d'une solution n/20 de glycyl-glycine rougissent l'azolithmine, l'addition de V gouttes de soude la rendent neutre. Il faut encore ajouter 2 cc. 25 de soude N/5 pour atteindre le rose tendre avec la phénol phtaléine.

Nous avons retrouvé cette acidité sur tous les échantillons que nous avons étudiés, nous avons obtenu le plus grand nombre de ces échantillons au moyen de la technique de E. Fischer. Un autre avait été préparé il y a vingt ans par M. le Professeur Hugounenq, nous en avons enfin réalisé un certain nombre par la méthode de Maillard. On voit donc que, quelle que soit la technique employée pour obtenir la glycyl-glycine on aboutit à un corps légèrement acide de P_H : 5,4.

La molécule de glycyl-glycine comporte donc un

48. V. HENRIQUES et S. SORENSSEN, UBER die quantitative Bestimmung der aminosäuren, Polypeptide und der Hippursäure in Harne durch formoltitration. *H. Zeit. Physiol. Chemie*, 63, 1909, p. 27-40.

hydrogène mobile et nous la représentons d'abord par le schéma :



Réalisons, a présent l'expérience suivante :

1° Prenons une certaine quantité d'une solution à 1 % de glycyl-glycine, ajoutons quelques gouttes de rouge de méthyle, nous obtenons un virage de ce réactif avec une goutte de soude N/20 ($P_H : 5$), ajoutons 20 cc. d'une solution dédoublée de formol du commerce amenée au point de virage du rouge de méthyle par une addition de soude ($P_H : 5$), nous avons une libération des groupes COOH, par formation du composé :



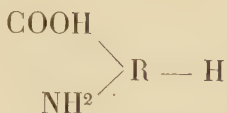
nous titrons en retour et nous trouvons :

$$N \text{ libéré} = 10,64 \% \quad \text{Théorie : } 10,6 \%$$

En somme, nous pouvons dire que, si nous réalisons une formol-titration en négligeant l'acidité du produit, c'est-à-dire, en employant un réactif qui vire aux environs du P_H de la glycyl-glycine, nous libérons une quantité d'ions H qui se montre équivalente à la quantité de groupement NH^2 captés par le formol. C'est ce qu'avaient vu Henriquès et Sörensen qui donnent le conseil suivant : « Wenn es sich um reine Lösungen von ammonium und Aminverbindungen handelt, kann es somit keinem Zweifel unterliegen das Lackmus bei der neutralisation, dagegen bei der eigentlichen Formoltitrierung Phenolphthalein (bis zu stark roter Farbe) zu verwenden ist ».

Nous pouvons donc écrire que au P_H 5,4, la quantité d'ions H des groupes COOH est exactement neu-

tralisée par une quantité équivalente de groupes NH^2 et l'on peut figurer ainsi l'ensemble des faits que nous venons d'observer :



par un schéma qui n'a d'autre prétention que de représenter l'égalité des groupes COOH et NH^2 et la présence d'un hydrogène mobile conférant à la molécule une certaine acidité.

Voyons à présent quelles sont les relations de cet hydrogène mobile avec le groupement NH^2 . Pour cela amenons la solution de glycyl-glycine au rose tendre de la phénol-phtaléine, c'est-à-dire portons la de $\text{P}_H = 5,4$ à $\text{P}_H = 8,3$ par addition de x_1 centimètres cube de soude $\text{N}/20$.

Si l'hydrogène mobile est indépendant de l'existence du groupe aminé, l'addition de formol qui fait disparaître ce groupement n'agira pas sur l'hydrogène mobile, et libérera seulement les groupes COOH qui exigeront pour être neutralisés à leur tour une quantité x_2 de soude $\text{N}/20$ égale à la quantité x de soude nécessaire pour neutraliser la totalité des groupes carboxyles, et l'on aura : $x_2 = x$. Au contraire, si l'existence de l'hydrogène mobile est lié à l'existence du groupe NH^2 , toute addition de formol faisant disparaître les groupes NH^2 (par transformation en un nouveau groupe : $-\text{N} = \text{CH}^+$), fera en même temps disparaître l'hydrogène mobile. Les ions Na^+ qui avaient servi à le neutraliser seront libérés et ser-

viront à neutraliser une part des groupes COOH libérés par le formol. Au total, la quantité de soude que l'on devra ajouter pour la formol-titration sera de x (quantité théorique) moins x_1 quantité ajoutée avant l'addition de formol pour porter la glycyl-glycine de $P_{11} = 5,4$ à $P_H = 8,3$ et l'on aura :

$$x^2 = x - x_1$$

C'est cette seconde formule que vérifie l'expérience qui donne :

a) Titration au rouge de méthyle :

10,64 d'azote pour 100 de glycyl-glycine

b) Titration à la phénol-phtaléine :

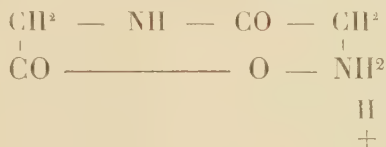
Quantité de soude nécessaire pour porter au rose de la phénol-phtaléine (PH : 8,3) calculé en azote pour 100 gr. de glycyl-glycine	4,2
Quantité de soude nécessaire pour retourner à la même teinte après addition de formol, calculé comme précédemment	6,44
Total	10,64

Nous avons trouvé ces chiffres constamment sur des échantillons de provenances diverses. Ils semblent peu influencés par les modifications de température de la solution.

Nous résumons donc ces faits en disant que la glycyl-glycine présente en solution un PH égal à 5,4 ce qui laisse supposer qu'elle possède un hydrogène mobile. Que d'autre part, l'existence de cet hydrogène mobile semble liée à l'existence du groupement NH^2

Ces faits étant acquis, essayons de les interpréter par un schéma moléculaire : nous pouvons imaginer trois types d'explication :

a) La formule de la glycyl-glycine peut être écrite sous une forme bêtaïnique, analogue à celle que Wilstätter a proposé pour le glyocolle et qui serait :



Cette formule présente en effet un hydrogène mobile, dont l'existence est liée à l'intégrité du groupe NH^2 .

Il y a là une explication très satisfaisante pour la glycyl-glycine qui fournit ainsi un hétérocycle heptagonal. Mais elle s'adapte mal aux polypeptides plus élevés.

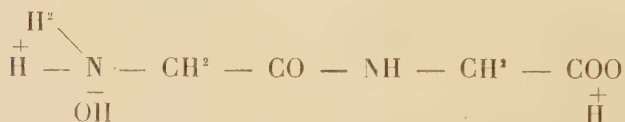
b) La formule de la glycyl-glycine comporte un groupe : $\text{CO} - \text{NH}$ qui constitue ce que Victor Meyer ⁴⁹ en 1887 désignait sous le nom de radicaux organiques « à caractère négatif » et que Vorländer a proposé d'appeler en 1901 plus justement « groupe réactif » ⁵⁰. L'activité de ce groupe étant sans doute due à sa double liaison : $\text{C} = \text{O}$. Des groupes semblables se retrouvent par exemple dans l'acide urique.

Cependant, pour accepter cette hypothèse, il nous faut admettre que l'action de ces groupes disparaît lorsque se transforme la fonction amine.

49. V. MEYER, *Ber.* 20, p. 534 et 2994 : 21 p. 1295.

50. VORLÄNDER, *Ber.* 34, p. 1633, 1901.

c) Une explication physico-chimique échappe en partie aux critiques que nous avons adressées aux précédentes hypothèses. Nous pouvons supposer en effet que la glycyl-glycine est en solution aqueuse partiellement dissociée. La portion dissociée pouvant être représentée par la formule :



Représentons par K_a le coefficient de dissociation de l'ion OH^- , par K_b , le coefficient de dissociation de l'ion H^+ , nous comprenons que si l'on a $K_b > K_a$, la solution est acide. Cependant toute addition de soude destinée à la ramener à la neutralité substituera un ion Na^+ à l'hydrogène mobile.

Une telle substitution diminuera d'autant la titration post-formolique.

Or, la quantité de soude qui doit être ajoutée est d'autant plus grande que le pouvoir tampon du corps en solution est lui-même plus grand. Le fait qu'il faut pour ramener une solution de glyocolle à la neutralité beaucoup moins de soude que pour ramener à la neutralité une solution de glycyl-glycine, révèle simplement que le pouvoir tampon du glyocolle est inférieur à celui de la glycyl-glycine.

En résumé : les faits montrent que la glycyl-glycine comporte un hydrogène actif, amenant ses solutions à un P_H : 5,4. L'existence de cet hydrogène semble liée à l'intégrité du groupe aminogène. Nous voyons imparfaitement encore, le mécanisme intime

de la production de cet hydrogène mobile. Nous pensons qu'il traduit l'existence d'un équilibre entre diverses formes.

Voyons les conséquences de ce fait :

1° Réalisons l'expérience suivante :

Prenons une quantité connue de glycyl-glycine en solution dans l'eau, ajoutons lui d'abord quelques gouttes d'une solution N/10 de nitrate d'argent, puis goutte à goutte, une solution titrée de soude N/20 jusqu'à ce qu'un léger trouble se produise dans la solution. Nous sommes obligés d'ajouter x cc. de soude qui, transformés en azote pour cent grammes de glycyl-glycine, donnent : 11,4 (théorie de l'azote aminé : 10,6).

Nous en concluons que la soude formée fut utilisée pour constituer un glycyl-glycinate de soude. C'est seulement lorsque tous les carboxyles de la glycyl-glycine furent épuisés que nous avons eu dans notre solution de la soude en liberté qui immédiatement a donné un trouble d'hydrate d'argent.

Au moment où l'opération est terminée, une addition de phénolphtaléine donne une teinte rouge foncée : P_H : 9,1.

Ainsi de P_H 5,4 à P_H 9,1, la solution de peptide se comporte comme un acide et fixe des ions positifs.

Reprenons à présent les expériences classiques de Loeb sur les protéines.

Deux faits mis en évidence par cet auteur méritent d'attirer l'attention du chimiste.

a) Les protéines fixent des cations du côté alcalin de leur point iso-électrique alors qu'elles fixent des anions du côté acide du point iso-électrique.

b) Le point iso-électrique est généralement dans une zone acide. C'est ainsi qu'il est de $P_H : 4,7$ pour la gélatine.

Si l'on se place au point de vue purement chimique, le P_H 5,4 de la glycyl-glycine se comporte comme un véritable point iso-électrique, puisque du côté acide de ce P_H la glycyl-glycine fixe des cations et se comporte comme un acide.

2° Si nous titrons à présent des acides aminés en nous servant de la seule phénol-phtaléine portée au rose comme indicateur, avant comme après addition de formol, nous trouvons les chiffres suivants : gly-cocolle :

Après addition de formol, nous utilisons une	
quantité de soude qui calculé en azote pour	
100 gr. de glycocolle, donne	0,45
Après addition de formol, nous utilisons une	
quantité de soude qui calculée de la même	
façon donne	17,87
Total	18,32
Théorie	18,66

Donc le même phénomène que nous avons signalé pour la glycyl-glycine se retrouve pour le glycocolle, mais il est ici à peu près négligeable. Nous l'avons retrouvé toujours très faible d'ailleurs chez d'autres amino-acides. C'est ainsi que par exemple pour la leucine racémique de synthèse, on a :

Avant formol	0,04 %
Après formol	10,04 %
Total	10,04 %
Théorie	10,69

La plupart de ces corps ne confèrent pas d'acidité au liquide où ils se trouvent en solution et la légère erreur que nous notons provient de la quantité de soude nécessaire pour passer de P_H 7,7 (neutralité) à P_H : 8,3 (rose de la phénolphthaléine).

En pratique, nous en concluons que pour la formol-titration telle que nous l'avons pratiquée, les acides aminés sont correctement dosés alors que, au contraire, les polypeptides fournissent des chiffres beaucoup trop faibles.

C. — *Etude du dosage Van Slyke*

Van Slyke dans son premier mémoire a signalé que le dosage des groupe aminés au moyen de l'acide nitreux donne des chiffres trop élevés pour certains polypeptides. La glycyl-glycine lui a donné les chiffres suivants (calculé : 10,60) : 13,13 — 13,72 — 14,13 — 14,32. Nous avons avec nos produits trouvé : 13,09. Il est possible que l'on dose une partie de l'azote de l'autre groupe aminé.

Le glyocolle qui pour Van Slyke donne une erreur (18,98 au lieu de 18,67) nous a donné un chiffre théorique.

Nous voyons donc que :

1° Nos formol-titrations nous donnent des chiffres trop faibles pour les polypeptides et au contraire des chiffres à peu près exacts pour les aminos-acides.

2° Les dosages Van Slyke fournissent des chiffres trop élevés pour les polypeptides et des chiffres exacts pour les aminos-acides.

Il semble donc que l'écart V.S. — S., dont nous avons étudié les variations au cours de l'hydrolyse acide, provienne de la présence des polypeptides. Cet écart atteignant son maximum au moment où le maximum des polypeptides se trouve en liberté dans le liquide d'hydrolyse.

Nous avons donc là un moyen de suivre la libération des polypeptides au cours des hydrolyses.

Si notre hypothèse est exacte, si l'écart noté entre le dosage Van Slyke et le dosage au formol est maximum pour les polypeptides, nous allons voir cette différence diminuer constamment pendant l'hydrolyse des polypeptides et en particulier de la glycylglycine. Voici quels sont nos résultats :

1° Acidité en HCl : 2,992 %

Départ	V.S... 12,8	8,04	1/4	V.S... 13,375	8,335
	S..... 4,76			S..... 5,04	
1	V.S... 13,834	7,683	6	V.S... 15,478	5,678
	S..... 6,16			S..... 9,8	
11	V.S... 16,627	5,14	25	V.S... 18,68	3,84
	S..... 11,48			S..... 14,84	
35	V.S... 18,68	3,84			
	S..... 14,84				

2° Acidité en HCl : 5,45 %

Départ	V.S...	13,8	10,16	1/4	V.S...	14,7	10,36
	S.....	3,64			S.....	4,34	
1/2	V.S...	15,25	8,11	6	V.S...	20,36	3,28
	S.....	7,14			S.....	17,08	
10	V.S...	20,97	3,05	18	V.S...	21	2,94
	S.....	17,92			S.....	18,06	

Ces hydrolyses nous montrent deux particularités sur lesquelles il convient d'insister.

1° Les hydrolyses de glycylglycine suivies au moyen de dosages par formol-titration aboutissent à un plateau lorsque l'hydrolyse est pratiquée à une acidité suffisamment basse (inférieure à 3 %), au contraire elles libèrent la totalité de l'azote aminé lorsque l'acidité du milieu est supérieure à ce chiffre.

2° La différence V.S. — S. que nous étudions va bien en décroissant comme nous l'avions prévu (une très légère élévation notée dans les premières minutes provient sans doute de la persistance inévitable de faibles quantités de cyclo-glycyl-glycine qui se rompent très rapidement.

Nous allons retrouver ces caractères dans l'étude de deux corps qui en s'hydrolysant produisent de la glycyl-glycine avant d'aboutir à la libération de glyco-colle.

1° La cyclo-glycyl-glycine préparée par les deux techniques que nous avons fournies donne un corps cristallisé blanc de neige, assez facilement soluble dans l'eau, donnant la réaction d'Abderhalden avec l'acide picrique en milieu basique. Le dosage d'azote

pratiqué par la méthode de Kjeldahl nous a donné 24,76 % (Théorie : 24,56). Le dosage Sørensen comme le dosage Van Slyke ne révèlent pas de groupements NH^2 libres. Chauffée au bloc Maquenne, elle commence à se décomposer vers 215° , noircit à 250° et disparaît vers 260° en donnant de légères vapeurs blanches.

Nous avons systématiquement étudié son hydrolyse à diverses acidités :

Acidité en HCl : 1,496 %

Cycloglycylglycine
(FISCHER)

TH	N %	$K = \frac{x}{v \cdot t}$
1/4	4,2	8,4
1/2	5	7,07
4	5,6	2,8
12	5,6	

Acidité en HCl : 1,87 %

Cycloglycylglycine
(MAILLARD)

4	7,35
6	8,12
14 3/4	8,68
23	9,1
38	9,44
47 1/2	9,8
57	9,72
66	9,52

Cycloglycylglycine
(FISCHER)

TH	N %	$K = \frac{x}{\sqrt{t}}$
2	7	
5	7,35	
8	7,91	
11	8,19	
15	8,61	
25 1/2	8,75	
28 1/2	9,38	
31	10,36	
36	10,22	

Acidité en HCl : 5,45 %

Cycloglycylglycine

1/4	7,56	15,1
1/2	9,24	13,2
1	11,76	11,76
2	15,54	11
6	21,56	7,19
10	25,8	8,1

Acidité en HCl : 7,48 %

Cycloglycylglycine
(MAILLARD)

4	19,2
6	22,12
30	21,76
38	21,98

Cycloglycylglycine

TH	N %	$K = \frac{\lambda}{\sqrt{t}}$
3	19,88	
4	19,2	
5	21,21	
6	22,12	
11 3/4	22,26	

Acidité en HCl : 11,22 %

Cycloglycylglycine

5 m.	2,31	
1/4	10,74	21,5
1/2	14,14	20,2
1 H	21,07	21,07
2	23,3	16

Nous voyons que là encore nous aboutissons à des plateaux pour des acidités suffisamment basses.

Nous pouvons donc en conclure que les albumines qui toutes, sauf la fibroïne, aboutissent à de semblables plateaux, se comportent comme les cyclopeptides et les polypeptides.

Et nous devons nous demander si la fibroïne n'a pas une constitution différente des autres protéines, ne comportant pas de cyclopeptides.

L'étude des différences V.S. — S. nous a donné :

a) Acidité en HCl : 1,496 %

1/4	V.S...	13,2	9	1/2	V.S...	15,97	10,97
	S.....	4,2			S.....	5	
4	V.S...	16,5	10,9	12	V.S...	16,02	10,42
	S.....	5,6			S.....	5,6	

b) Acidité en HCl : 5,45 %

1/4	V.S...	18,49	10,93	1/2	V.S...	20,86	11,62
	S.....	7,56			S.....	9,24	
1	V.S...	21,75	9,39	2	V.S...	22,028	6,4
	S.....	11,76			S.....	15,54	
6	V.S...	26	4,44	10	V.S...	26	0,2
	S.....	21,56			S.....	25,8	

c) Acidité en HCl : 11,22 %

5 m.	V.S...	12,48	10,17	1/4	V.S...	20,4	9,69
	S.....	2,31			S.....	10,74	
1/2	V.S...	22,66	8,52	1	V.S...	25,62	4,55
	S.....	14,14			S.....	21,07	
2	V.S...	27	3,7		V.S...		
	S.....	23,3			S.....		

On voit facilement que cette hydrolyse comporte deux temps : l'un ascendant, assez rapide, aboutit à la libération de la glycyl-glycine et réalise alors un écart maximum entre les deux dosages. Il se réalise en 1/2 heure pour les hydrolyses à faible acidité et en 1/4 d'heure pour les hydrolyses à forte acidité.

La rupture des cycles de la cyclo-glycyl-glycine dans l'hydrolyse acide est donc d'autant plus rapide que l'acidité est plus forte.

Nous devons enfin noter que la réaction d'Abderhalden pratiquée au cours de l'hydrolyse des cyclopeptides disparaît à la fin de la première demi-heure indiquant, elle aussi, la libération totale des polypeptides à ce moment.

2°. — Nous avons pensé que la disposition énoïque des groupes CO — NH de la cycloglycyl-glycine pouvait peut être influencer leur hydrolyse. Nous nous sommes donc efforcé de préparer de telles formes, Nous avons pour cela employé une technique due à E. Abderhalden et E. Schwab ⁵¹. Elle consiste à chauffer deux grammes de cyclo-glycyl-glycine avec quatre à cinq parties d'aniline (purifiée au préalable par entraînement à la vapeur d'eau et dessication sur CaCl² fondu). Le chauffage se réalise en une heure au bain d'huile à 205°-210. Par extraction à l'éther au Soxhlet on élimine ensuite l'aniline. L'obtention d'un corps parfaitement blanc est laborieuse.

Ce corps en solution dans l'eau décolore lentement et à froid le permanganate de potasse, ce qui montre sa nature non saturée.

L'étude systématique de son hydrolyse ne nous a pas montré de différence avec celle de la cyclo-glycyl-glycine.

3°. — Nous avons pratiqué l'hydrolyse au moyen

51. E. ABDERHALDEN et E. SCHWAB, Formes desmotropes des di-oxop. et des polypeptides. *Zeit. f. Physiol. chem.* 1926, T. 153, p. 83-87.

d'une acidité en HCl de : 1,496 % de l'acétyl-glycyl-glycine anilide. Là encore, nous relevons l'existence des deux temps déjà décrits.

L'acidité du milieu croit (sans doute par la libération de : CH^3COOH jusqu'au moment où l'écart entre les deux dosages est maximum, elle décroît ensuite.

1/2	V.S...	4,554	3,71	1,5	V.S...	7,87	5,37
	S.....	0,84			S.....	2,5	
2,5	V.S...	10,7	6,92	9,5	V.S...	10,97	6,35
	S.....	3,73			S.....	4,62	

En résumé :

Nous avons noté que le dosage Van Slyke donne pour les polypeptides un chiffre le plus souvent beaucoup trop élevé.

D'autre part, les formol-titrations pratiquées avec un seul indicateur de neutralité : la phénol-phtaléine de P_H 8,3, donnent un chiffre qui pour la glycyl-glycine est beaucoup trop faible.

Il s'ensuit un écart maximum entre les deux dosages des polypeptides. Nous pensons que cet écart explique les différences notées dans l'étude de l'hydrolyse des protides suivies au moyen de ces deux dosages.

CHAPITRE VIII

ÉTUDE DE LA DIGLYCYL-GLYCINE

Nous avons préparé de la diglycyl-glycine selon la méthode indiquée par Fischer ⁵².

1° Dans un premier temps, nous avons préparé du chlorhydrate de glycyl-glycine en faisant dissoudre la cyclo-glycyl-glycine dans l'acide chlorydrique (1,19). Au bout de 48 heures d'abandon à la température du laboratoire, nous avons obtenu de beaux cristaux mesurant parfois plus d'un centimètre.

2° 15 gr. de chlorhydrate de glycyl-glycine sont dissout dans 160 cc. de soude normale refroidie à 0°, puis on ajoute alternativement et par petites portions 10 gr. de chlorure de chloracétyl en solution éthérée et 160 cc. de soude normale (en commençant par le chlorure de chloracétyl).

On ajoute ensuite la quantité nécessaire d'HCl, pour neutraliser. On évapore dans le vide (20 mm.) jusqu'à 120 cc.

On refroidit à 0° et on obtient une première récolte de chloracétyl glycyl-glycine.

52. E. FISCHER, Aminosäuren polypeptide protéine. 1899-1906, p. 350.

On évapore à sec les eaux mères sous pression réduite, on reprend le résidu par 200 cc. d'alcool chaud. L'alcool est évaporé et le résidu épuisé à l'eau chaude. On fait cristalliser par refroidissement. Le rendement indiqué par Fischer est de 11 gr. 4 au total.

3° Le chloracétyl glycyl-glycine est ensuite dissous dans NH^3 à 25 %, 5 gr. du corps chloré pour 25 cm^3 d' NH^3 , au bout de 15 heures l'halogène est parti, on évapore au bain-marie pour chasser NH^3 . Le résidu est dissout dans 10 cm^3 d'eau. Si l'on ajoute au liquide chaud 50 cc. d'alcool absolu, il se sépare une masse huileuse qui bientôt se transforme en une masse cristalline.

Pour la purifier, on redissout dans l'eau et on reprécipite par une fois et demie le volume d'alcool.

Plusieurs essais nous ont toujours donné des rendements très médiocres et très inférieurs à ceux indiqués par Fischer.

Après plusieurs purifications, nous avons en très petite quantité un produit blanc, biurétique.

La solution de diglycyl-glycine, additionnée de quelques gouttes de rouge de méthyle, montre un corps qui vire au jaune canari par l'addition d'une goutte de soude N/20. Après addition de formol, il faut une quantité de soude qui, calculée en azote, donne 6,8 % pour ramener ce corps à la neutralité (théorie: 7,4).

Le même dosage avec la phénol-phtaléine montre un corps qui nécessite une assez grosse quantité de soude pour arriver à la neutralité, soit, calculé en azote pour 100 parties du corps : 3,5 %. Après addition de

formol, on doit ajouter une quantité de soude, qui en azote représente 3,4 %, pour revenir à la neutralité.

Donc le phénomène signalé pour la glycyl-glycine se retrouve pour la diglycyl-glycine.

Elle relève sans doute du même système d'explication.

Elle permet de penser que l'erreur de titration signalée pour les dipeptides se retrouve pour les tripeptides.

CHAPITRE IX

INTERPRÉTATION DE NOS RÉSULTATS

L'étude de la glycyl-glycine, de la cyclo-glycyl-glycine et de la diglycylglycine nous a donc montré deux faits importants:

1° Ces peptides hydrolysés par des liquides d'acidité chlorhydrique croissante n'aboutissent point au moins pour les hydrolyses de faible acidité à une libération totale de leurs amino-acides.

2° La glycyl-glycine présente un écart très important entre ses deux dosages Van Slyke et formolique. Cette différence s'atténue au fur et à mesure de la libération des amino-acides pendant l'hydrolyse. Elle s'accuse au contraire en un premier temps, au cours de l'hydrolyse de la cyclo-glycylglycine pendant que se forme de la glycyl-glycine et disparaît au moment de la libération du glycocolle.

Nous appuyant sur ces faits, nous pensons pouvoir formuler une hypothèse qui nous conduira dans l'interprétation des courbes qui représentent l'évolution de la différence Van Slyke moins Sørensen au cours de l'hydrolyse des protéines.

Elle peut se formuler ainsi:

La différence obtenue entre les dosages Van Slyke et Sörensen (à double neutralisation par la phénol-phtaléine) augmente au fur et à mesure que se trouvent libérés les dipeptides. Elle s'atténue au contraire au moment où ceux-ci se rompent pour libérer les amino-acides.

On peut en déduire immédiatement que:

1° Toute variation selon l'axe des ordonnées correspond à une différence quantitative des polypeptides.

2° Toute variation selon l'axe des abscisses traduit une différence dans la rapidité de libération si la courbe est ascendante ou de leur scission en amino-acides si la courbe est descendante.

En fonction de cette hypothèse, essayons d'interpréter les variations de nos courbes et, dans une revue générale des propriétés que nous avons notées, efforçons-nous aussi de grouper les protéines en une classification basée sur leur comportement au cours de l'hydrolyse acide.

I. — Nous pouvons isoler un premier groupe de protides formé par la fibroïne, la gélatine et l'édestine. Si nous examinons la figure 16, qui représente les variations de leur différence N. V. S. - N. S. pour une acidité en HCl de 11,22 %, nous voyons leurs trois courbes affecter une même allure. Rapidement ascendantes, elles dessinent une véritable arête aiguë.

Ces protéides libèrent rapidement et en quelque sorte, de façon massive, leurs polypeptides. Ceux-ci

apparaissent en grande abondance dans le liquide d'hydrolyse en moins d'une heure d'ébullition.

Très rapidement aussi, ils vont disparaître ; la chute des courbes non moins brusque que leur ascension indique que les peptides libérés éclatent et se divisent en amino-acides.

Si nous nous reportons aux graphiques obtenus avec une acidité plus faible de 5,45 % (Fig. 15), la gélatine et l'édestine conservent la même allure générale, la fibroïne évolue d'abord rapidement, puis se montre plus traînante. En un mot ces courbes reproduisent donc les précédentes, selon un rythme plus lent et selon un type atténué, ce qui s'explique parfaitement par la diminution d'acidité.

Si nous comparons à présent cet aspect des courbes avec l'allure générale de celle de la cyclo-glycyl-glycine (Fig. 15), nous notons une similitude absolue, même brusquerie dans l'élévation et dans la descente.

Nous nous sommes demandé si cette allure des courbes, cette faible résistance des groupes peptidiques n'étaient point dues à l'abondance du glycolle, celui-ci pouvant former des groupements peptidiques particulièrement fragiles.

Le taux évidemment élevé de la gélatine et de la fibroïne en glycolle (environ 30 %) paraît d'abord justifier cette opinion.

Cependant, la faible teneur de l'édestine en glycolle (3,8 %) ne permet pas de la maintenir.

En somme, nous pouvons seulement affirmer, d'après l'étude de la différence N. V. S. - N. S., que les trois protides: gélatine, fibroïne et édestine, sont

constitués par des groupements de polypeptides d'une particulière fragilité.

Convient-il donc de conclure à un type unique de constitution pour ces protides ?

Nous ne le pensons pas.

Chacun d'eux présente un aspect bien particulier.

1° La fibroïne doit être d'abord nettement individualisée. L'étude du développement des groupes NH^2 lui confère un aspect très spécial. Si l'on se reporte aux courbes de la figure 1, on voit que, alors que les autres protides de cette acidité très basse marquent tous un plateau presque immédiat, lequel indique un arrêt de l'hydrolyse, seule la fibroïne monte en une droite qui tend vers une hydrolyse totale. Cette différence se retrouve sur toutes les courbes obtenues aux diverses acidités (voir les figures 3, 5, 7, 8, 10, 12). Ainsi, la fibroïne se caractérise facilement par son hydrolyse acide. Elle prend d'emblée un aspect original. Donc l'hydrolyse, même au moyen de catalyseur léger, la transforme toujours totalement en amino-acides.

Cette vulnérabilité très spéciale de la fibroïne est d'autant plus étrange à constater que l'on connaît sa résistance aux hydrolyses fermentaires. Elle souligne la différence profonde du mécanisme d'action des deux agents chimiques et biologiques.

Elle est sans doute aussi la traduction cinétique d'une certaine particularité de constitution. La fibroïne est souvent considérée comme une albumine très simple, une albumine schématique, et notre étude confirme cette opinion.

L'étude de ses amino-acides nous a montré une prédominance marquée des acides aminés à chaîne linéaire simple : glycolle et alanine dont l'azote représente 65 % de l'azote total de ce protide.

Faut-il chercher dans cette composition la raison de sa grande simplicité de constitution ? Peut-être aussi convient-il de l'attribuer au mode de groupement des amino-acides. Il n'est pas sans intérêt de rapprocher les faits que nous notons du résultat des études rôentgengraphiques de Brill. Pour cet auteur, le cristal de soie est constitué par des groupements dont le type semble formé par les « corps hauts moléculaires » de Bergmann dont l'hydrolyse livre des tétrapeptides, laissant ainsi supposer l'existence dans leurs molécules non de cycles à deux amino-acides, mais de cycles à quatre amino-acides.

Un tel groupement doit, sans doute, conférer à l'hydrolyse de la fibroïne, son allure particulière.

2° La gélatine présente des courbes de différence N.V.S.-N.S. en tous points comparables à celle de la fibroïne. Leur allure générale est absolument la même et la même rapidité de libération des polypeptides les caractérise.

Cependant, l'étude du développement des groupes aminés de cette albumine offre des plateaux qui la différencient nettement de la fibroïne. L'étude systématique des courbes de la cyclo-glycyl-glycine nous a montré ces mêmes plateaux. Nous pensons donc qu'une telle allure des graphiques témoigne d'une constitution cyclopeptidique du protide qui le présente. L'examen des amino-acides de cette albumine

nous indique, comme dans le cas de la fibroïne, la prédominance nette des molécules en chaînes linéaires simples (glycocolle, valine, alanine, leucine) qui représentent 42 % de l'azote total.

3° L'édestine se caractérise par une libération un peu plus lente de ses polypeptides. Par contre, leur éclatement en amino-acides semble plus rapide. L'allure de ses courbes N.V.S.-N.S. donne avec une grande netteté l'aspect en arête que nous avons signalé précédemment.

Elle aussi présente des plateaux, mais encore que l'azote total de l'édestine soit à peu près égal à celui de la gélatine, ces plateaux sont toujours pour une égale acidité, inférieurs à ceux de cette albumine. Peut-être convient-il de rapprocher ce fait de la plus grande résistance des groupes polypeptidiques de l'édestine.

Elle se présente donc parmi les albumines du premier groupe que nous avons établi comme la plus résistante à l'hydrolyse. Celle-ci libère toujours moins d'azote que pour les deux autres albumines. Les polypeptides sont isolés plus lentement, mais par contre, éclatent peu après leur libération.

II. — Si nous abordons à présent le second groupe de protides, nous trouvons réunies, d'après l'allure traînante de leurs courbes, l'ovalbumine, la clupéovine et la caséine.

Il s'agit de trois albumines qui, physiologiquement, répondent à une même nécessité : la nutrition du jeune. Or, les biochimistes ont déjà établi entre ces

protides plus d'une analogie de constitution. M. le Professeur L. Hugounenq, étudiant les amino-acides de la clupéovine, remarque leur analogie avec ceux des deux autres protéines. Il note une quantité totale d'azote qui est sensiblement la même que pour l'ovalbumine et l'édestine.

Nous croyons apporter aujourd'hui une preuve de plus en faveur de ce qu'avait notre Maître. L'analogie que nous notons dans nos études repose sur deux constatations :

1° L'étude des courbes qui traduisent le développement des groupes aminés pendant l'hydrolyse montre une confusion presque constante des graphiques, même allure générale, hauteur le plus souvent semblable des plateaux.

2° L'étude de la différence N.V.S. — N.S. montre elle aussi de grandes ressemblances.

Pour ces trois protides, la libération des peptides se fait lentement et progressivement. Les lignes de différences tendent à l'horizontalité ou descendent faiblement, marquant par là que, au fur et à mesure que se libèrent des amino-acides, de nouveaux peptides sont produits qui maintiennent constant l'écart de dosage.

Cette marche traînante est très nette sur la figure 16, elle apparaît encore sur la figure 15.

Ainsi se trouvent rapprochés ces protides par leur similitude chimique. Nous avons là trois albumines : l'une provient de l'œuf de poisson, l'autre de l'œuf d'oiseau, la troisième est destinée à servir à l'alimentation du jeune mammifère. L'analogie de constitu-

tion est cependant telle que rien sur nos courbes ne permet de les différencier. En dépit des différences morphologiques de l'animal adulte, les éléments qui serviront à l'édification de ses molécules restent les mêmes.

III. — La chupéine mérite une place à part. On connaît sa constitution très particulière. Formée presque essentiellement d'arginine (82 %), sa molécule comporte en outre quelques amino-acides encore assez incomplètement étudiés, parmi lesquels on a noté la sérine. La courbe traduisant les variations de la différence N.V.S. — N.S. de cette albumine (Fig. 15) évolue très lentement. La rupture des groupements peptidiques en polypeptides semble particulièrement traînante.

La courbe traduisant la libération des groupes aminogènes (Fig. 9) présente deux aspects successifs bien différents. Elle contraste par là, avec les courbes des autres protides qui se développent avec une certaine régularité.

Nous pensons que le premier temps qui traduit une libération rapide de ces groupes peut être expliqué par l'abandon d'un certain nombre d'amino-acides qui, sans entrer dans la charpente même de cette protamine, constituent plutôt des éléments surajoutés. Ces aminos-acides ne provenant pas des peptides, ne s'inscrivent pas sur la figure 15, qui ne porte pas de déformation.

Le second temps, plus lent, provient, pensons-nous, de la libération des diamines depuis les poly-

peptides. Il correspond à la courbe de la figure 13. Ce temps est lent et régulier.

En résumé, la clupéine doit donc être constituée par une charpente peptidique à base d'arginine sur laquelle se fixent en quelque sorte superficiellement d'autres amino-acides.

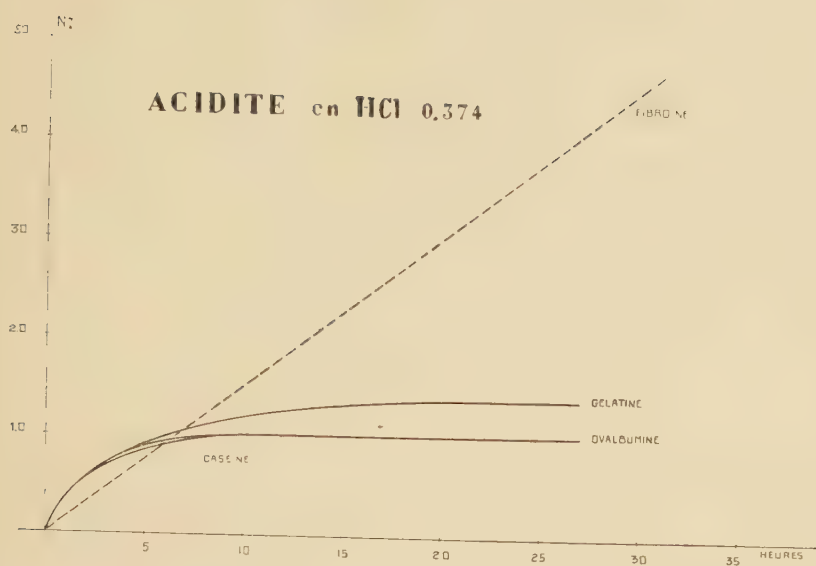


FIG 1

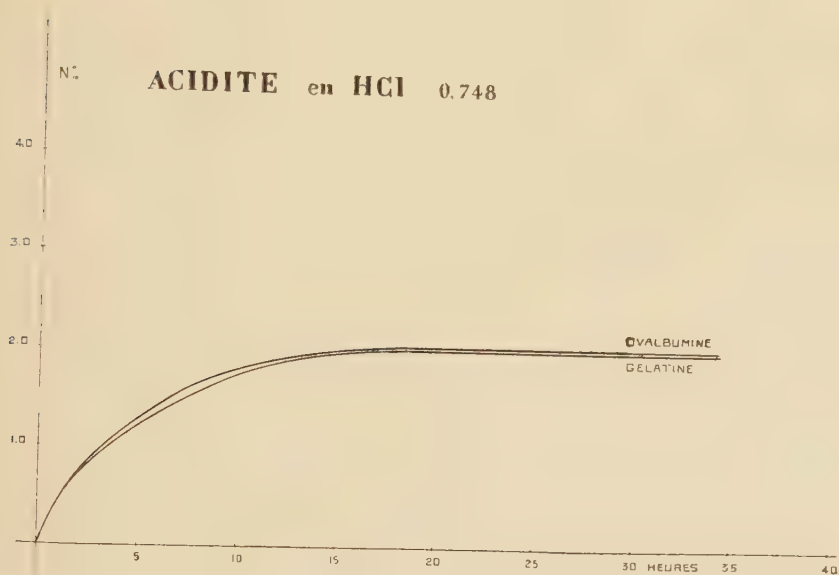
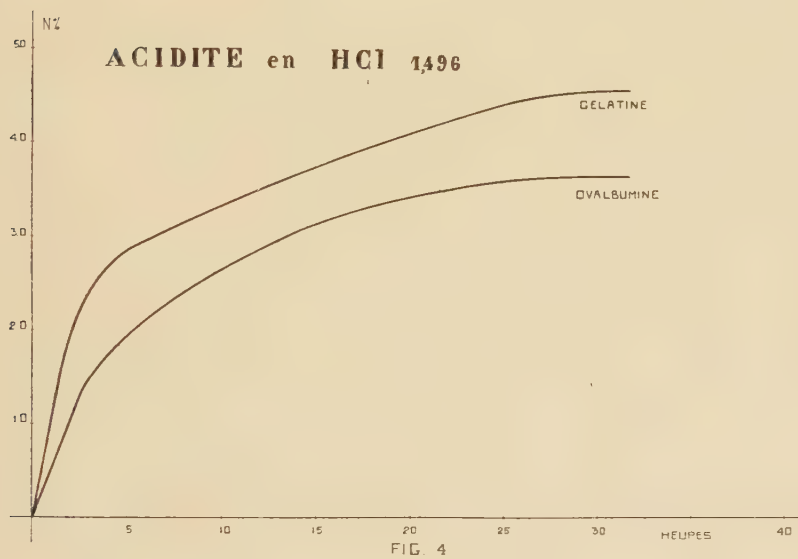
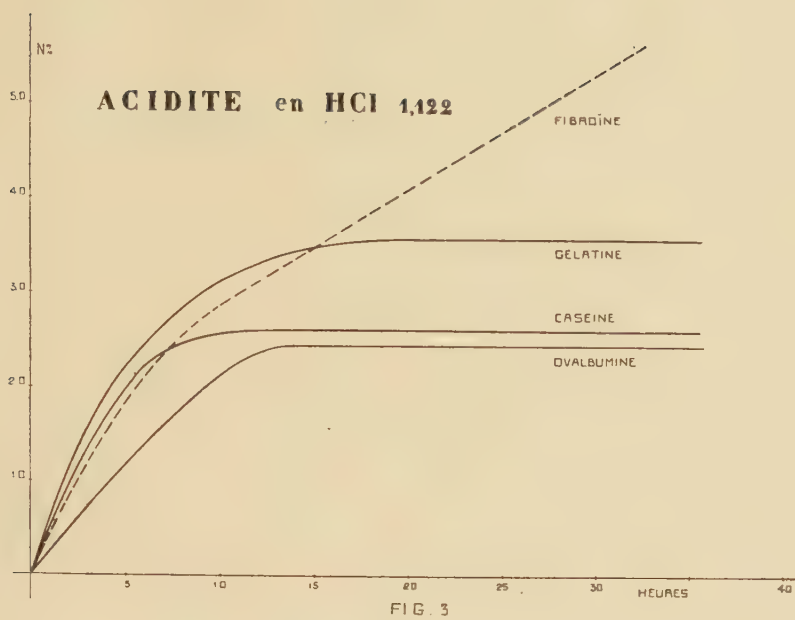


FIG. 2



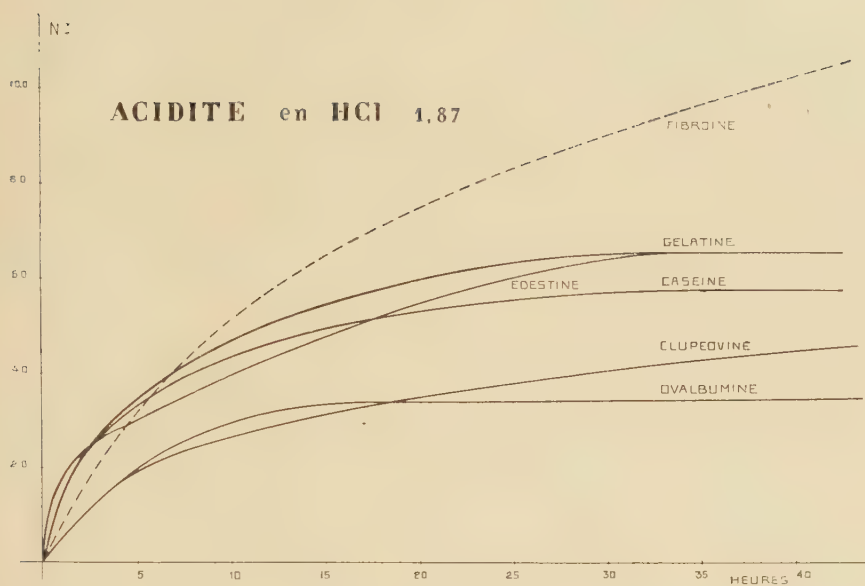


FIG 5

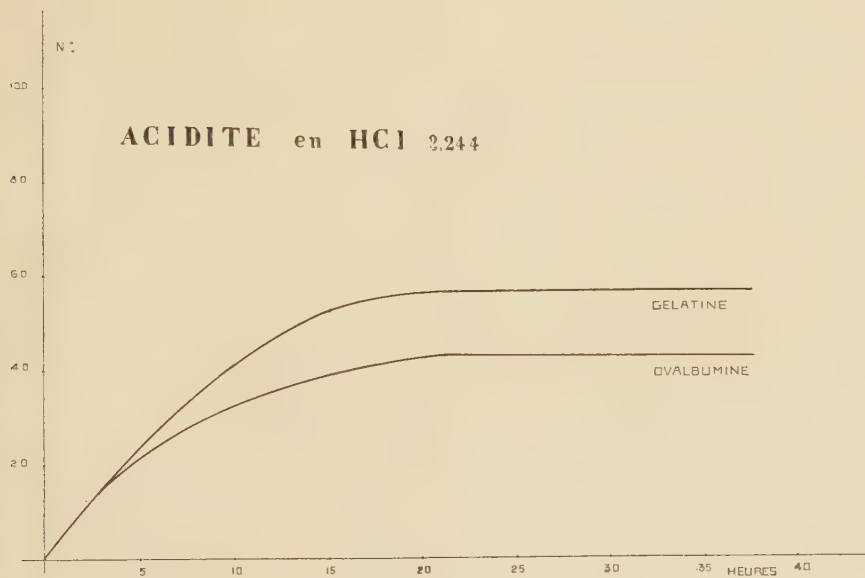
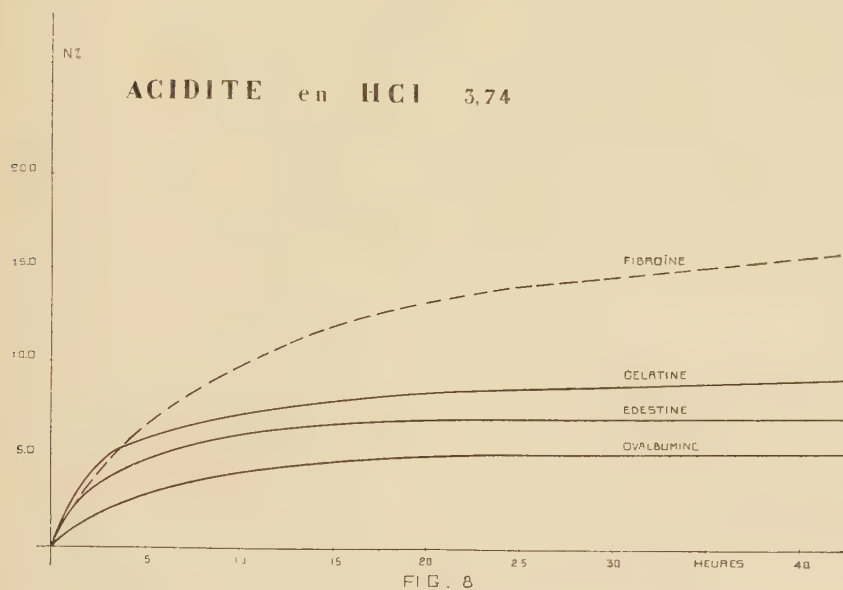
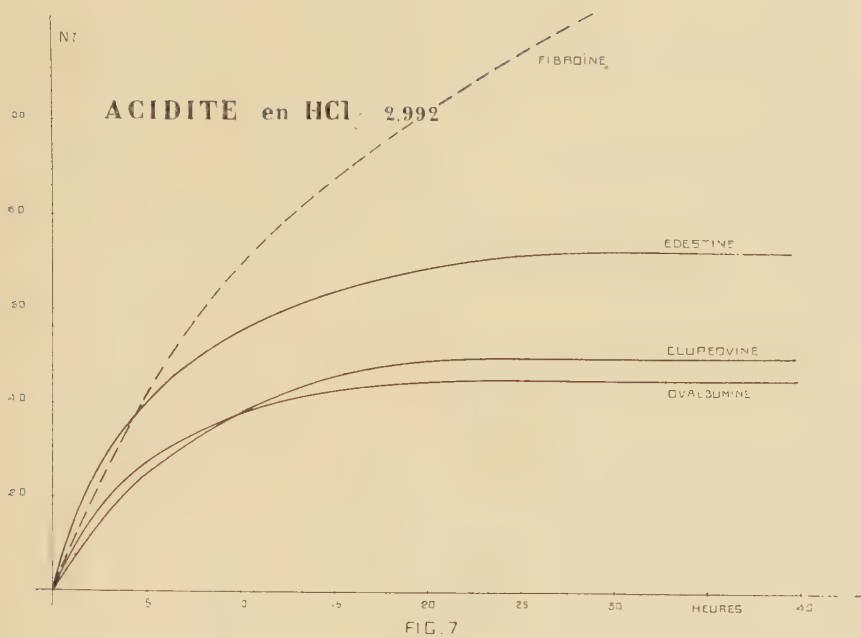


FIG 6



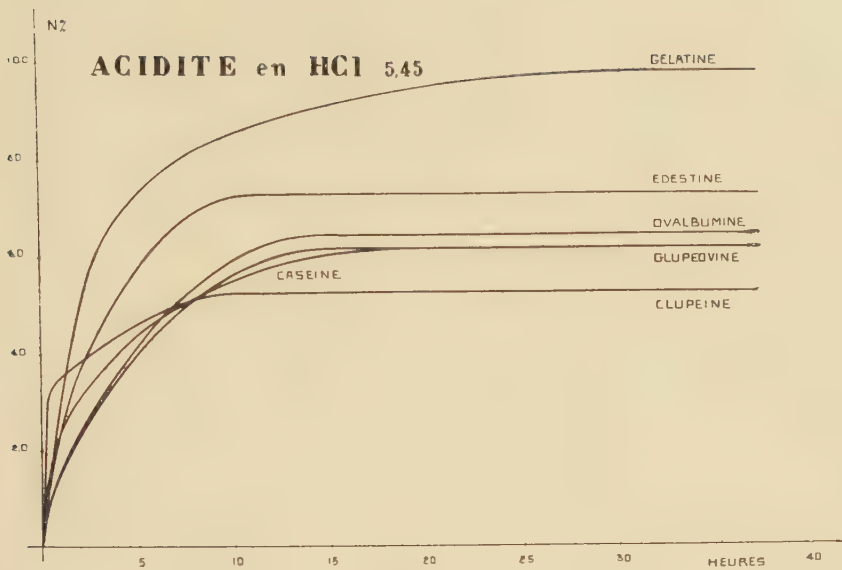


FIG 9

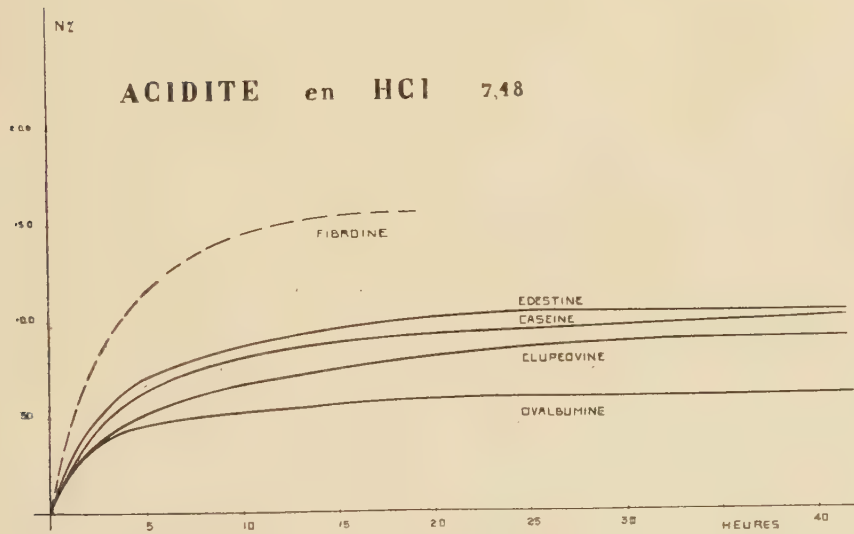
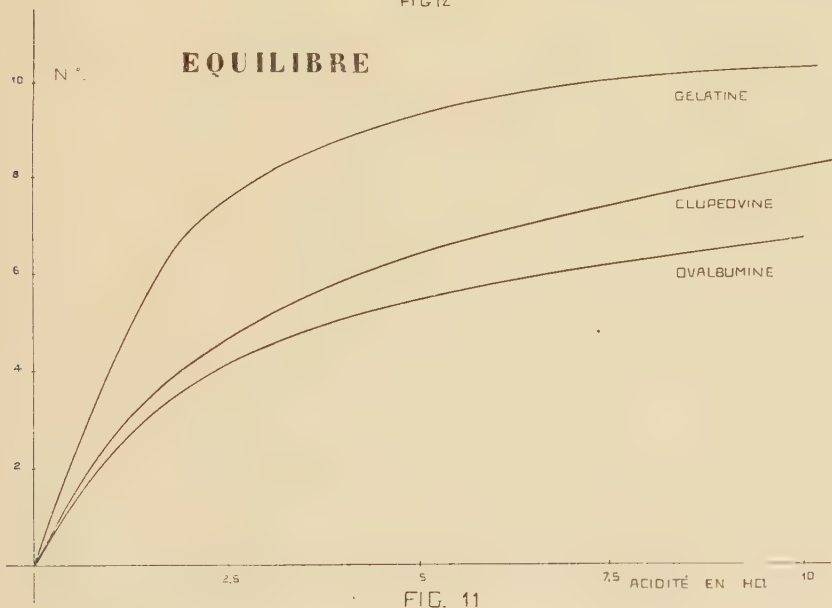
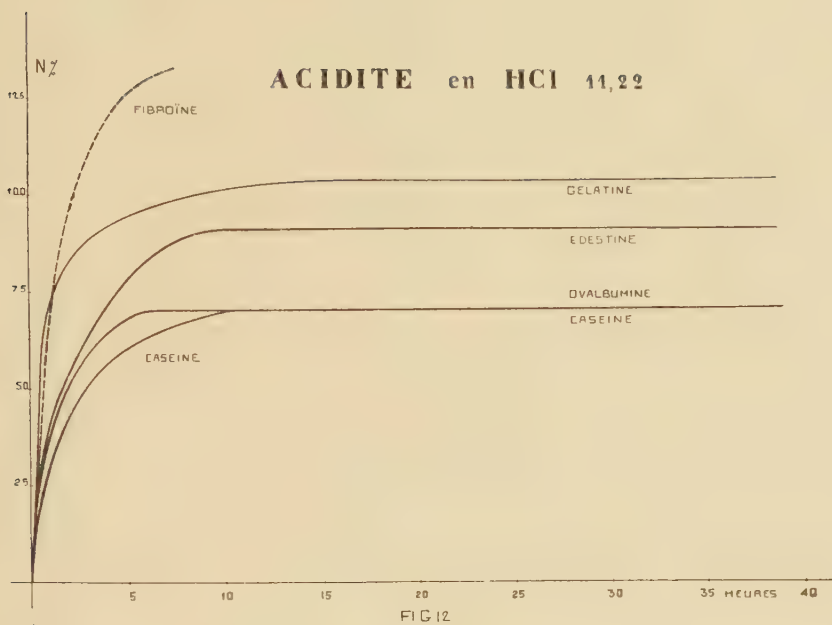
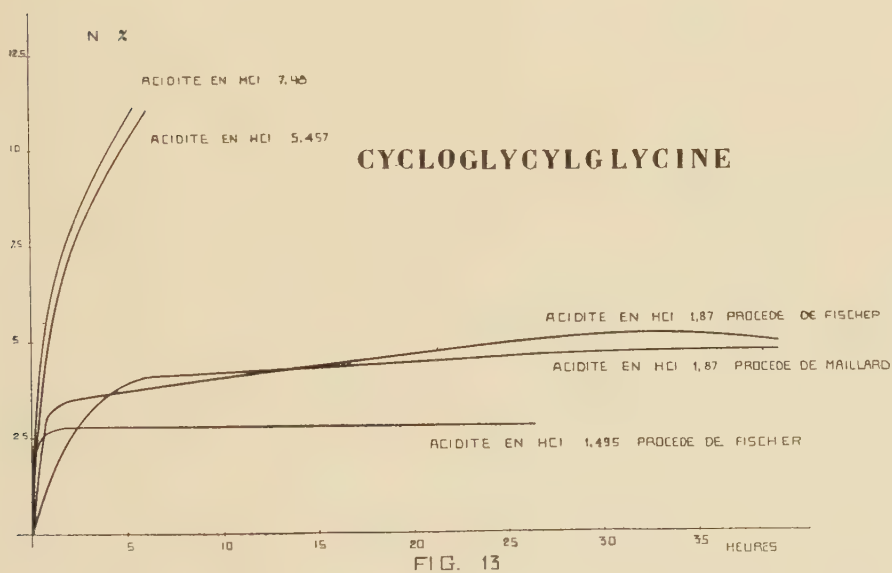
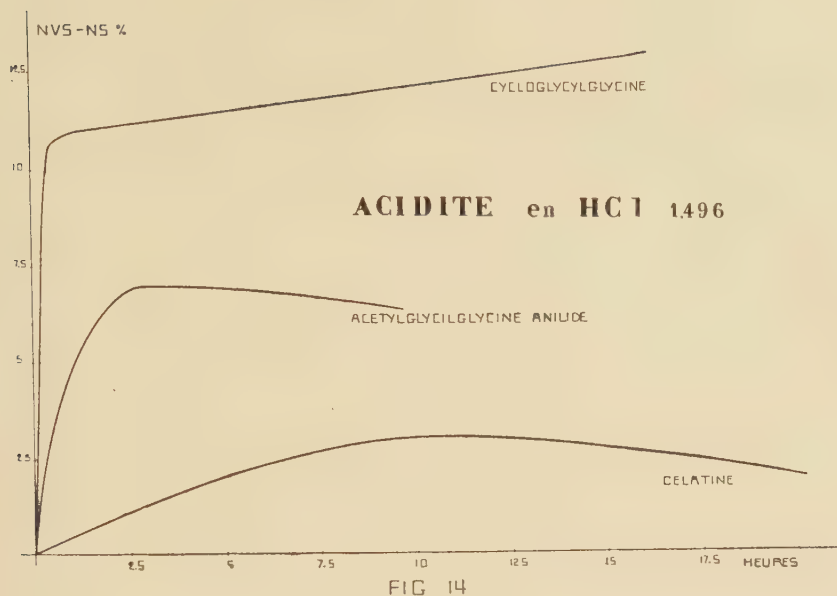


FIG 10







NVS-55%

ACIDITE en HCl 11.22

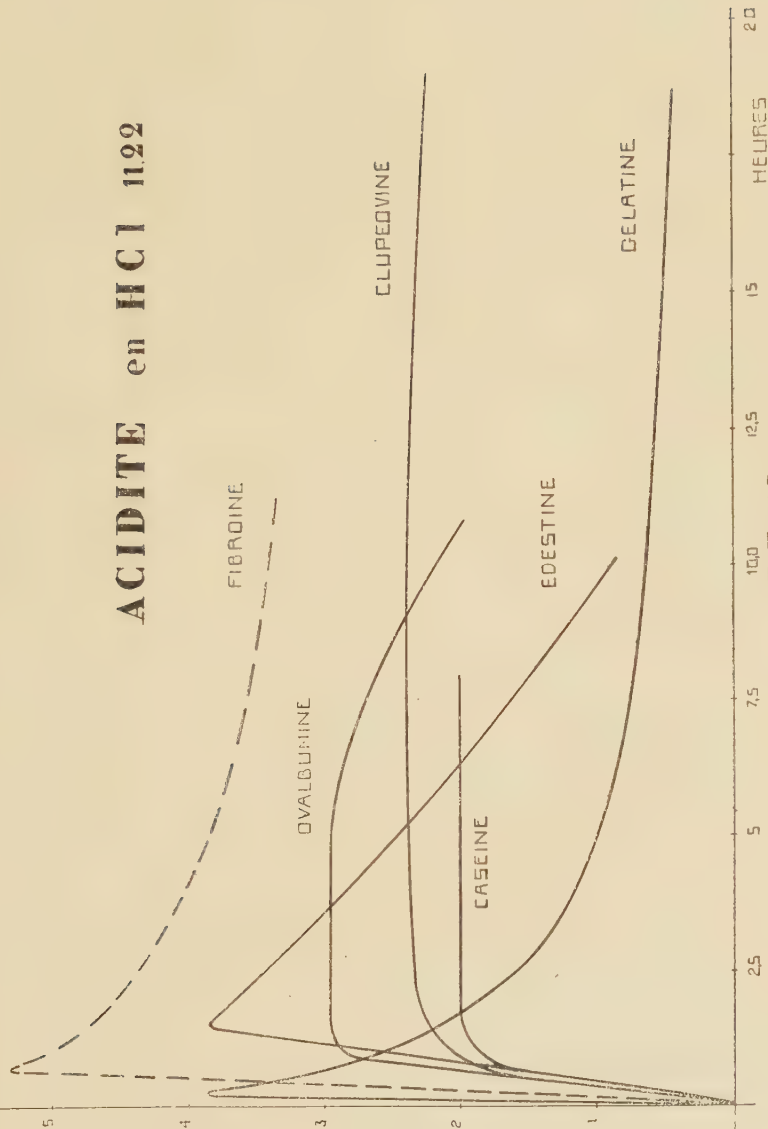


FIG. 16

CHAPITRE X

SUR LA CONSTITUTION DE LA CHITINE ⁵³

Ledderhose, en 1878 ⁵⁴, étudiant la carapace des homards et crustacés, fut le premier à en isoler un sucre aminé : la glucose-amine qu'il démontra être l'élément constitutif principal de cet organe. Depuis, l'existence de ce corps si particulier, fut reconnue dans d'autres tissus animaux, chez les mollusques, dans les enveloppes des chrysalides (Furth et Russo) ⁵⁵. De même Winterstein ⁵⁶, Gilson ⁵⁷, Reuter ⁵⁸. Roos ⁵⁹, étudiant la mycosine des champignons, démontrèrent que ce squelette fibreux était constitué par une substance chimiquement très proche de la chitine et fournissant, comme elle, après hydrolyse de la glucose-amine.

53. En coll. avec G. Florence.

54. LEDDERHOSE, Über chiten und serine spaltproducte. *Zeitschrift für physiologische Chemie*. 2, 1878, p. 213.

55. FURTH u. Russo, Über krystalliniche chitosan verbindungen aus Sepiaschulpen. *Beitr. Zur Kenntniss des chitins. Beiträge Zur Chem. Phys. u. Pathol.* 8, 1906, p. 163.

56. WINTERSTEIN, Über ein Stikstoffhaltiges Spaltungsprodukt der Pilz. cellulose. *Ber. der deut. chem. Gess.* 27, 1894, p. 3113.

57. GILSON, Das chitin und die membranen der Pilzzellen. *Ber. der deut. chem. Gess.* 28, 1895, p. 821.

58. REUTER, Beiträge zur Kenntniss der stickstoffhaltigen Bestandteile der Pilze. *Zeitsch. f. phys. chemie*, 78, 1912, p. 167.

59. Roos, Der Ursprung bei der Hydrolyse von Boliters edulis erhaltenen Glucosamins. *Bioch. Journal*. 9, 1915, 313-319.

Les premières recherches sur la constitution de la chitine furent faites par Araki ⁶⁰. Cet auteur démontra que la chitine traitée par de l'acide sulfurique dilué se transformait en un polymère de la glucose-amine, la *chitosane*, en abandonnant de l'acide acétique. Si l'on poussait l'hydrolyse de la chitosane, on obtenait finalement de la glucose-amine après libération d'acide acétique.

Mais le mode d'enchaînement des molécules de glucose-amine et d'acide acétique reste encore obscur.

Kotaka et Sera ⁶¹ ont étudié parallèlement la constitution d'une substance azotée extraite d'un champignon le lycoperdon : la lycoperdine.

Cette substance de formule $C^{13}H^{24}N^2O^9$ est lévogyre et donne la réaction du biuret. Elle réduit la liqueur de Fehling.

Il nous a semblé intéressant, pour essayer d'éclairer les points encore obscurs de la constitution de la chitine, de suivre progressivement l'hydrolyse de cette substance dans la libération du groupement NH^2 d'une part et dans l'apparition progressive des propriétés réductrices d'autre part.

Préparation de la chitine et de la glucose-amine

Nous avons utilisé de la chitine pure, préparée de la façon suivante :

60. ARAKI, *Über das Chitosan. Zeitschrift für phys. Chemie.* 20, 1895, p. 498.

61. KOTAKA et SERA, *Ueber eine neue glucose-amine Verbindung, Beitrag zur Konstitution des Chitins. Zeitsch. für physiol. chemie*, 88, 1913, p. 56-72 ; 89, 1914, p. 482.

Des carapaces de homards, soigneusement débarrassées de tous débris musculaires, ont été traitées à froid pendant 48 heures par de l'acide chlorhydrique du commerce dilué au 2/3. Cette opération a été renouvelée trois fois jusqu'à ce que tout le squelette minéral ait été dissous.

Les fragments découpés plus finement aux ciseaux ont été plongés dans une solution alcaline de potasse, ce qui a eu pour effet de les décolorer presque entièrement après un bon lavage de plus de 6 heures à l'eau courante. Les carapaces ont été plongées dans une solution à 5 p. 1000 de permanganate de potasse. Traitées ensuite par une solution d'hyposulfite de soude, elles sont devenues parfaitement blanches, après un lavage de plusieurs heures, la chitine ainsi préparée a été séchée et était prête pour l'hydrolyse.

La préparation de la glucose-amine est simple. On l'obtient en effet facilement sous forme de chlorhydrate en hydrolysant la chitine pendant 3 heures à l'ébullition avec de l'acide chlorhydrique fumant. Lorsque la dissolution est complète, on évapore au B. M. dans le vide après filtration, jusqu'au début de cristallisation. Par refroidissement, le chlorhydrate de glucose-amine cristallise en magnifiques cristaux. Nous avons pu améliorer considérablement les rendements en pratiquant cette hydrolyse en milieu réducteur, par l'adjonction de quelques fragments d'étain. Le liquide d'hydrolyse, au lieu de se colorer fortement, reste à peine teinté et cette coloration disparaît presque entièrement lorsque, après avoir précipité l'étain par l'hydrogène sulfuré, on filtre pour se débarrasser

du sulfure métallique. Après évaporation dans le vide, le chlorhydrate cristallise parfaitement blanc et n'a pas besoin de précipitation ultérieure.

..

Nous avons réalisé un certain nombre d'hydrolyses acides de chitine, en nous plaçant dans les conditions expérimentales que nous avons adoptées pour les protides.

Nous nous sommes assuré au préalable de la valeur des dosages que nous aurions à réaliser. Pour cela, nous avons préparé du chlorhydrate de glucose-amine très pur par un grand nombre de cristallisations successives.

Un dosage du groupe NH^2 libre dans le chlorhydrate de glucose-amine, par la méthode de Van Slyke, nous a donné 6.32 % alors que la théorie prévoit 6,49 %.

Des dosages Bertrand sur des solutions plus ou moins concentrées nous ont montré qu'il existe une proportion directe entre la quantité de chlorhydrate de glucose-amine employée et la quantité de cuivre réduit, on a ainsi :

Solution à 2 gr. 230 pour 100 cc.

1 cc. réduit 0 gr. 042 de cuivre

Solution à 0 gr. 223 pour 100 cc.

1 cc. réduit 0 gr. 0042 de cuivre

Solution à 0 gr. 0223 pour 100 cc.

1 cc. réduit 0 gr. 00042 de cuivre

Ainsi 42 mmgr. de cuivre réduit correspondent d'après notre expérience à 22,3 mmgr. de chlorhydrate de glucosamine. D'après G. Bertrand, ils correspondent à 21 mmgr. de glucose.

Nous avons donc pratiqué des prélèvements au cours de l'hydrolyse de la chitine et sur ces prises d'essai nous avons réalisé, d'une part, un dosage de la fonction réductrice par la technique de Bertrand, d'autre part, un dosage de la fonction amine par un dosage Van Slyke.

Nous avons obtenu les résultats suivants :

1° Acidité en HCl : 5,45 %.

La quantité d'azote aminé libéré est insignifiante et ne peut être exactement dosée.

Le sucre par contre suit un développement régulier, on a :

Heures	10	20	29
Sucre en glucose....	3,92	5,2	9,32

2° Acidité en HCl : 11, 22 %

Heures	Sucre %	N Van Slyke %	<u>Sucre</u> <u>Azote</u>
7	13,4	1,2	11,1
16	24	2,19	10,9
23	29,6	2,85	10,3
35	38		

3° Acidité en HCl : 29,92 %

Heures	Sucre %	N Van Slyke %	<u>Sucre</u> <u>Azote</u>
2	21	4,06	5,1
6 1/4	46	5,57	8,25
10	64	5,31	12
19	88	5,31	16

Nos observations montrent deux points :

1° Alors que le sucre se développe de façon régulièrement croissante, l'azote-aminé arrive vite à la constitution d'un équilibre et, dès lors, cesse de se développer.

sucre

2° Le rapport azote qui serait constant si une liaison en se rompant libérait à la fois une fonction amine et une fonction aldéhyde, est au contraire le plus souvent extrêmement variable. A peine une légère correspondance pour une acidité en HCl : 11,22 % doit-elle être notée.

Nous en concluons que, dans la plus grosse partie de la molécule, il existe une indépendance absolue entre les deux fonctions amine et aldéhyde.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

I. — Nous avons poursuivi l'étude de la cinétique de l'hydrolyse des protides.

La libération des groupements aminés était provoqué par des liquides d'acidité croissante. Elle était suivie au moyen de dosages Van Slyke et de dosages Sørensen. Elle s'est réalisée avec une extrême régularité.

Les graphiques qui traduisent la marche de ces différentes hydrolyses nous permettent de distinguer deux types de protides.

Le plus souvent (lorsqu'il s'agit de la gélatine, de la caséine, de la clupéine, de la clupéovine, de l'ovalbumine, de l'édestine cristallisée) les courbes aboutissent à des plateaux qui traduisent l'établissement d'un équilibre. Ces équilibres sont d'ailleurs d'autant plus élevés que la quantité d'agent d'hydrolyse employée est elle-même plus grande. Pour les acidités

faibles, la formule $K = \frac{x}{V_t}$ donne assez exactement

la valeur de la constante d'hydrolyse.

La fibroïne, au contraire, même en présence de faible quantité d'acide, libère toujours la totalité de ses groupements aminés et se transforme toujours intégralement en amino-acides.

Sa constante d'hydrolyse peut être considérée comme étant du premier ordre $(K = \frac{1}{t} \text{Log}_n \frac{x}{a-x})$

Les cyclopeptides de synthèse présentent une hydrolyse du premier type aboutissant à des plateaux.

Nous pensons trouver là un argument en faveur d'une constitution cyclo-peptidique des protéines telles que la gélatine, la caséine, la clupéine, la clupéovine, l'ovalbumine et l'édestine cristallisée.

Nous pensons au contraire que la fibroïne présente au moins pour la portion principale de sa molécule une constitution différente.

II. — Nous avons pu montrer que la glycyl-glycine et la diglycyl-glycine en solution aqueuse comportent un hydrogène mobile, dont l'acidité n'est point compensée par la basicité des groupes aminés. L'existence de cet ion hydrogène est liée à l'intégrité du groupe NH^2 . Nous avons émis diverses hypothèses pour expliquer sa nature.

De ce fait résultent deux conséquences :

a) Nous avons montré que du côté alcalin du $\text{P}_H = 5,4$ la glycyl-glycine s'unit aux métaux et se comporte comme un acide. Le $\text{P}_H = 5,4$ présente donc les caractères d'un véritable point isoélectrique si l'on donne à cette dénomination un sens purement chimique.

b) La présence de cet hydrogène mobile et le pouvoir tampon assez élevé de la glycyl-glycine occasionnent de gros écarts de dosages, si l'on pratique la

formol-titration au moyen de réactifs colorés, dont le virage se réalise dans la zone alcaline.

III. — L'expérience montre que la titration au formol obtenue avec une double neutralisation (pré et post formolique) au moyen de la phénol-phtaléine comme indicateur fournit pour la glycyl-glycine et la diglycyl-glycine des chiffres inférieurs à ceux qu'exige la théorie.

Il est de notion classique au contraire que le dosage selon la technique de Van Slyke fournit un chiffre trop élevé.

Il s'établit donc pour les polypeptides un écart important entre ces deux dosages, et cette différence peut être facilement calculée. Nous l'avons désignée par le symbole N.V.S. — N.S. Cette différence n'existe pas pour les amino-acides.

Nous avons suivi son évolution :

a) Pendant l'hydrolyse de la cyclo-glycyl-glycine, elle arrive rapidement à son maximum au moment où est libéré la glycyl-glycine par éclatement du cycle. Elle s'atténue ensuite au fur et à mesure que le peptide se scinde en glycocolle.

b) Nous retrouvons le même phénomène pendant l'hydrolyse de l'acétyl-glycyl-glycine anilide.

c) Il réapparaît encore au cours de l'hydrolyse des protéines. La différence N.V.S. — N.S. s'accroît passe par un maximum puis décroît jusqu'à la fin de l'hydrolyse. Nous pensons que le moment de son maximum correspond à la présence d'une quantité maximum de polypeptides dans le liquide d'hydrolyse.

Nous avons, de ces faits, déduit une technique qui nous permet de suivre la libération des polypeptides au cours de l'hydrolyse des protéines, puis leur division en amino-acides. Elle nous a permis de classer les protéines d'après leur comportement vis-à-vis de l'hydrolyse acide.

IV. — Nous avons ainsi pu caractériser :

a) La fibroïne qui libère rapidement ses polypeptides et se présente comme peu résistante à l'hydrolyse acide.

Nous avons vu que la forme des courbes du développement de ses groupes NH^2 au cours de l'hydrolyse permet de lui supposer une constitution très particulière, nous avons à ce point de vue rappelé l'opinion de Brill, opinion basée sur des études roentgenographiques.

b) La gélatine aussi labile que la fibroïne, mais aboutissant toujours à des plateaux qui rappellent le type cyclopeptidique.

c) Un groupe formé par des albumines servant à la nutrition du jeune (ovalbumine, caséine, clupéovine).

Les albumines de ce groupe suivent la même évolution hydrolytique et ne peuvent être différenciées les unes des autres. Elles libèrent lentement leurs polypeptides et s'opposent au type à rupture brusque des groupes peptidiques que représentent bien la fibroïne et la gélatine.

d) L'édestine cristallisée, qui apparaît en quelque sorte comme intermédiaire entre les classes précédentes. Ses groupes peptidiques présentent une certaine

résistance, mais les polypeptides se scindent en acides aminés peu après leur libération.

e) Enfin, la clupéine, qui offre une très grande résistance à l'hydrolyse. Ses groupes peptidiques ne se détruisent que très lentement, tandis que des amino-acides n'entrant probablement pas dans la charpente peptidique de cette protamine, s'en séparent très rapidement.

V. — Notre étude nous a donc conduit à une classification chimique qui semble s'accorder assez bien avec une classification physiologique qui grouperait d'une part les protéines servant à la constitution des tissus adultes et d'autre part les protéines destinées à la nutrition du jeune.

VI. — Accessoirement, nous avons étudié la marche de l'hydrolyse de la chitine.

Nous avons montré l'indépendance dans la plus grosse part de la molécule des groupes aminés et des groupes aldéhydiques.

DEUXIEME THÈSE

Propositions données par la Faculté

1° CONSTITUTION PHYSICO-CHIMIQUE DU LATEX
2° FERMENTS ET ASYMÉTRIES MOLÉCULAIRES

VU ET APPROUVÉ :

*Le Doyen de la Faculté
des Sciences,*

Signé : V. GRIGNARD

LU ET APPROUVÉ :

Les membres du Jury,

H. CARDOT,
L. HUGOUNENQ,
J. BEAUVERIE,
CL. FROMAGEOT.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :

Lyon, le 21 mars 1930.

Le Recteur de l'Académie de Lyon,

Signé : JOSEPH GHEUSI.

TABLE DES MATIÈRES

	Pages
AVANT-PROPOS	3
CHAPITRE I. — Cinétique des réactions	11
CHAPITRE II. — Constitution des amino-acides utilisés dans notre étude	19
CHAPITRE III. — Préparation des albumines utilisées.	23
CHAPITRE IV. — Etude de la cinétique de l'hydrolyse des protéines	37
CHAPITRE V. — Etude de la marche de l'hydrolyse au moyen de la méthode de Van Slyke.	59
CHAPITRE VI. — Etude des variations de la différence N aminé Van Slyke moins N aminé Sørensen . .	65
CHAPITRE VII. — Etude de la glycyl-glycine et de la cyclo-glycyl-glycine	73
CHAPITRE VIII. — Etude de la diglycyl-glycine. . . .	97
CHAPITRE IX. — Interprétation de nos résultats. . .	101
CHAPITRE X. — Sur la constitution de la chitine. . .	111
CONCLUSIONS GÉNÉRALES	117

